

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр  
кардиологии» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**АВТАЕВА Юлия Николаевна**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК КРОВИ С АДГЕЗИВНОЙ БЕЛКОВОЙ  
ПОВЕРХНОСТЬЮ В УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО ПОТОКА И  
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ  
КЛЕТОЧНОГО ГЕМОСТАЗА НА ОСНОВЕ МИКРОФЛЮИДНОЙ  
ТЕХНОЛОГИИ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

3.1.28 – гематология и переливание крови

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Масенко Валерий Павлович

доктор биологических наук,  
Габбасов Зуфар Ахнафович

Москва – 2022

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

СПОСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. РОЛЬ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА В ГЕМОСТАЗЕ. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА. МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	14
1.1 Фактор фон Виллебранда в гемостазе, его структура и функции .....	14
1.2 Патологии, ассоциированные с фактором фон Виллебранда .....	27
1.3 Лабораторные методы диагностики нарушений функции фактора фон Виллебранда .....	38
1.4 Микрофлюидные технологии для оценки гемостаза .....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	49
2.1 Материалы .....	49
2.2 Дизайн исследования и характеристика здоровых добровольцев и больных, включенных в исследование .....	49
2.3 Приготовление образцов цельной крови и обогащенной тромбоцитами плазмы, определение плазменного уровня фактора фон Виллебранда в плазме крови .....	52
2.4 Микрофлюидная система для регистрации кинетики адгезии клеток крови к адгезивному белковому покрытию в условиях потока .....	53
2.5 Окрашивание образцов в проточной камере, образовавшихся в результате взаимодействия цельной крови с белковой поверхностью по методу Гимза и флуоресцентными красителями .....	57
2.6 Статистическая обработка данных .....	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. АДГЕЗИЯ КЛЕТОК КРОВИ К БЕЛКОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ В УСЛОВИЯХ ПОТОКА В ОБРАЗЦАХ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ И ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ .....	59
3.1 Адгезия тромбоцитов к фибриногеновой поверхности в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев .....	60
3.2 Адгезия клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови здоровых добровольцев .....	63

3.3 Адгезия клеток крови к коллагену I типа в образцах цельной крови здоровых добровольцев .....	67
3.4 Белково-клеточный состав структур, образующихся на поверхности проточной камеры с коллагеновым покрытием .....	69
<b>ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. АДГЕЗИЯ КЛЕТОК КРОВИ К ФИБРИНОГЕНОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ HEYDE, ИБС И НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19).....</b>	<b>73</b>
4.1 Адгезия клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с тяжелым аортальным стенозом и синдромом Heyde .....	73
4.2 Адгезия тромбоцитов к фибриногеновой поверхности в образцах ОТП и цельной крови пациентов с ИБС до 55 лет .....	76
4.3 Адгезия тромбоцитов к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) .....	78
<b>ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>	<b>81</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>90</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>93</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>94</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>95</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ №1. Технология изготовления микрофлюидной проточной камеры с использованием ПДМС .....</b>	<b>112</b>

**СПОСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**АДФ** – аденозиндифосфат

**АК** – аминокислота

**АО** – акридиновый оранжевый

**АС** – стеноз клапана аорты (аортальный стеноз)

**ВМФВ** – высокомолекулярный фактор фон Виллебранда

**ВОЗ** – Всемирная Организация Здравоохранения

**МЕ** – международные единицы

**НМФВ** – низкомолекулярный фактор фон Виллебранда

**СМФВ** – средномолекулярный фактор фон Виллебранда

**УВМФВ** – ультравысокомолекулярный фактор фон Виллебранда

**ФВ** – фактор фон Виллебранда

**БВ** – болезнь Виллебранда

**ИБС** – ишемическая болезнь сердца

**ИМ** – инфаркт миокарда

**мАт** – моноклональное антитело

**МФС** – микрофлюидная система

**ПДМС** – полидиметилсилоксан

**Тельца ВП** – тельца Вейбеля-Паладе

**ТТП** – тромботическая тромбоцитопеническая пурпура

**ТФ** – тканевой фактор

**ФВ:Аг** – анализ количества ФВ в плазме (антиген ФВ)

**ФВ:Аб** – анализ функционального состояния ФВ на основе связывания моноклональных антител

**ФВ:RCo** – анализ ристоцетин-кофакторной активности ФВ

**ФВ:GPIbM** – анализ связывания мутантного GP Ib с усилением функции

**ФВ:GPIbR** – анализ связывания ФВ GP Ib, инициируемое ристоцетином

**ФД** – фотодетектор

**ФИТЦ** – флуоресцеин изотионат

**ФСБ** – фосфатно-солевой буфер

**ADAMTS-13** (**a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 13**)

– дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом 1-го типа, 13

**COVID-19** – Coronavirus disease of 2019 (новая коронавирусная инфекция)

**DAPI** – 4',6-диамидино-2-фенилиндолом

**ELISA** - **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**

**FV** – фактор свертывания V

**FVII** – фактор свертывания VII

**FVIII** – фактор свертывания VIII

**FIX** – фактор свертывания IX

**FX** – фактор свертывания X

**FXI** – фактор свертывания XI

**FXII** – фактор свертывания XII

**GP Ib** – гликопротеин Ib

**GP IIb/IIIa** – гликопротеин IIb/IIIa

**GP VI** – гликопротеин VI

**SSC – ISTH** – Комитет по науке и стандартизации Международного общества по тромбозу и гемостазу

**PAR-1** – протеаза - активирующий рецептор 1

**PAR-4** – протеаза - активирующий рецептор 4

**PFA-100®** – Platelet Function Analyzer 100 (анализ функции тромбоцитов)

**PPACK** – **D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone** (H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone)

**PSGL-1** – P-селектин гликопротеиновый лиганд-1

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Гемостаз – процесс остановки кровотечения в месте повреждения сосуда и поддержания целостности сосудистой стенки за счет образования тромба. Гемостаз – физиологический процесс, который регулируется сложными взаимодействиями между факторами свертывания крови и клеточными элементами сосудистой стенки и крови (эндотелиальными клетками, тромбоцитами и т.д.). Повреждение сосудистой стенки, при котором обнажается субэндотелиальный матрикс, запускает процесс гемостаза. Гемостаз и тромбоз – процессы, связанные с ответом на повреждение сосудов, но гемостаз направлен на защиту организма от потери крови, а тромбоз – ключевой фактор патогенеза некоторых сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний. Как следствие, хронические сосудистые заболевания могут приводить к образованию внутрисосудистых закупоривающих тромбов, обычно вызванных возникновением дестабилизирующих явлений, таких как внезапный разрыв атеросклеротической бляшки [1]. Тромбоциты адгезируют на месте повреждения сосуда, запуская последующую агрегацию их друг с другом, необходимую для достижения гемостаза. В любом случае, адгезионные взаимодействия, опосредованные специфическими мембранными рецепторами, такими как GP Ib, GP IIb/IIIa (интегрин  $\alpha IIb\beta 3$ ) и GP VI [2], поддерживают первоначальное прикрепление тромбоцитов к сосудистой стенке. Поэтому адгезия тромбоцитов к структурам сосудистой стенки, друг к другу или к другим клеткам – грани одного и того же фундаментального процесса, зависящая от условий потока крови [3].

Среди молекулярных взаимодействий, регулирующих адгезию тромбоцитов, значительный интерес представляет взаимодействие тромбоцитов с фактором фон Виллебранда (ФВ). ФВ – мультимерный гликопротеин плазмы крови, который присутствует в эндотелиальных клетках, мегакариоцитах, тромбоцитах и соединительной ткани. Он опосредует адгезию тромбоцитов в условиях артериального кровотока. Помимо участия в адгезии тромбоцитов, ФВ также связывает и защищает от деградации фактор свертывания крови VIII [4]. Недавно

было показано, что ФВ участвует в воспалительных процессах, опосредуя связь между гемостазом, тромбозом и воспалением. Мультимеры ФВ и тромбоциты, прикрепленные к поврежденному или активированному эндотелию опосредуют рекрутирование лейкоцитов, что создает условия для распространения воспалительной реакции [5]. В исследованиях было продемонстрировано, что молекулы ФВ активируются в условиях потока, то есть способны к гидродинамической активации, изменяя свою конформацию с глобулярной на фибриллярную при скоростях сдвига выше  $5000 \text{ c}^{-1}$  [6]. Активация молекул ФВ делает доступными места связывания ФВ с коллагенами, тромбоцитами, лейкоцитами, металлопротеиназой ADAMTS-13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 13 – дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом 1-го типа, 13). Гидродинамические силы влияют и на функциональное состояние тромбоцитов. Связывание молекул ФВ с механо-чувствительным доменом GP Ib тромбоцитов способствует запуску каскада внутриклеточной сигнализации и, в конечном итоге, приводит к активации тромбоцитов [2]. Этот механо-сигнальный путь усиливает внешнее механическое воздействие тока крови на GP IIb/IIIa тромбоцитов, способствуя его переходу в активное состояние [7]. Активированный GP IIb/IIIa взаимодействует и с фибриногеном, и с ФВ, поддерживая агрегацию тромбоцитов. Тем самым, фактор фон Виллебранда – ключевой игрок клеточного гемостаза в условиях потока, в присутствии высоких скоростей сдвига.

Нарушение функций фактора фон Виллебранда, врожденные дефекты, дефицит синтеза его мультимеров или усиление протеолиза приводят к спонтанным кровотечениям, например, при болезни фон Виллебранда, или к криптогенным желудочно-кишечным кровотечениям, как при синдроме Heyde [8, 9]. В последние годы появились данные о том, что патологическая активация ФВ может приводить к развитию тромботических осложнений ишемической болезни сердца [10]. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), особенно ее тяжелое течение, характеризуется повышенным риском тромбоэмболических осложнений. Анализ секционных данных умерших от COVID-19 пациентов указывает на

тромботические изменения не только в макрососудах (тромбоэмболия легочной артерии, венозные тромбозы), но и в микрососудах альвеолярных капилляров [11]. Было выявлено, что у больных с COVID-19 повышается количество ФВ в плазме, вследствие повреждения эндотелия, и снижается активность ADAMTS-13. Было показано, что при COVID-19 происходит изменение в оси ФВ/ADAMTS-13 [11]. При этих патологиях тромбоциты функционально активны, но нарушение функций ФВ приводит к изменению зависимого от этого белка процесса адгезии тромбоцитов.

Таким образом, вклад активации фактора фон Виллебранда и функциональная оценка адгезии тромбоцитов, особенно в условиях потока, имитирующих поток крови в сосудах, могут быть информативными критериями в фундаментальных медико - биологических исследованиях, в лабораторной диагностике и мониторинге антитромбоцитарной терапии. Современные исследования механизмов адгезии и агрегации тромбоцитов и функционального состояния ФВ должны выходить за пределы статических условий и начинать учитывать реологические переменные, которые влияют на процессы гемостаза и тромбоза.

### **Степень разработанности темы**

В настоящее время для исследования нарушений гемостатической функции крови применяются методы, которые фокусируются на оценке сосудисто-тромбоцитарного и плазменного компонентов гемостаза, а также активности фибринолитической и антикоагулянтной систем организма. Оценка функционального состояния ФВ основана на проведении ристоцетин-кофакторного анализа агрегационной активности тромбоцитов и его вариаций, оценке способности ФВ связывать коллаген и фактор VIII свертывания крови. Эти способы измеряют активность фактора фон Виллебранда в статических условиях [12, 13]. Оценка распределения мультимеров ФВ по размерам является трудоемким, высокотехнологичным и дорогим методом исследования [14]. Распространенные на данный момент тесты оценки функции тромбоцитов, такие как оптическая или импедансная агрегометрия, VerifyNow® (США) и



Plateletworks® (США) не учитывают влияние потока или выполняются в условиях низких скоростей сдвига, либо основаны на морфометрическом анализе адгезированных тромбоцитов с помощью методов микроскопии [15]. Тест PFA-100® (Platelet Function Analyzer 100) (США) учитывает условия потока, но является аналогом времени кровотока [16].

На сегодняшний день разработан ряд различных микрофлюидных устройств для исследования клеточного гемостаза в условиях потока [15, 17-19]. Однако, эти устройства сложно устроены, дорогостоящие и для оценки полученных данных требуются высококвалифицированные специалисты, а получаемые результаты плохо стандартизируются и зависят от задач конкретных лабораторий. Таким образом, ни один из доступных в настоящее время методов оценки клеточного гемостаза, используемых в клинической практике, не дает возможности создавать условия контролируемого потока для исследования контактных взаимодействий тромбоцитов с адгезивной белковой поверхностью в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы или цельной крови.

### **Цель исследования**

Оценка взаимодействия клеток крови с белковой поверхностью в условиях контролируемого потока и разработка микрофлюидной системы для диагностики нарушений клеточного гемостаза.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи.

### **Задачи исследования**

1. Апробировать микрофлюидную систему для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковой поверхности (фибриноген, коллагены) в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови в условиях контролируемого потока.
2. Исследовать методами световой микроскопии (в том числе, флуоресцентной) клеточный и белковый состав структур, образовавшихся в результате взаимодействия образцов крови с белковыми поверхностями, в разработанной микрофлюидной системе в условиях контролируемого потока.

3. Оценить кинетику адгезии клеток крови на белковую поверхность (фибриноген) в условиях потока в образцах цельной крови у больных с синдромом Heyde.
4. Оценить кинетику адгезии клеток крови на поверхность, покрытую белком (фибриноген) у больных с ишемической болезнью сердца в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови в потоке при скоростях сдвига, характерных для коронарных артерий.
5. Оценить кинетику адгезии клеток крови на поверхность, покрытую белком (фибриноген) в образцах цельной крови у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в условиях потока.

### **Научная новизна**

Впервые будет создана и апробирована микрофлюидная система регистрации кинетики адгезии клеток крови к адгезивной белковой поверхности в условиях контролируемого потока в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови. Впервые будет исследован белково-клеточный состав структур, образовавшихся в результате взаимодействия образцов крови с белковыми поверхностями, в условиях контролируемого потока. Впервые будет оценено влияние ФВ на адгезию клеток крови к покрытой адгезивным белком поверхности в условиях потока у пациентов с ИБС, с синдромом Heyde, у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

### **Теоретическая и практическая значимость**

Создание микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к поверхности, покрытой белком (фибриноген, коллагены), позволит оценивать влияние ФВ на адгезию клеток крови к белковой подложке в условиях потока. Также система поможет определить клеточный и белковый состав структур, образующихся в потоке в результате взаимодействия крови с белковой поверхностью. Определение роли гидродинамической активации ФВ и его вклада в развитие желудочно-кишечных кровотечений у пациентов с синдромом Heyde и тромботических осложнений у пациентов с ИБС будет способствовать получению новых диагностических данных. Исследование вклада взаимодействия ФВ и GP IIb

тромбоцитов в адгезию клеток крови к белковой поверхности в потоке у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) позволит внести вклад в изучение патогенеза COVID-19.

### **Методология и методы исследования**

В основу методологии и теоретической части исследования легли данные, представленные в работах отечественных и зарубежных авторов, а также в научных трудах в области клинической лабораторной диагностики, гематологии и кардиологии. В них особое внимание уделялось исследованиям структуры и функций фактора фон Виллебранда, принципам диагностики и терапии болезней, ассоциированных с ФВ, а также микрофлюидным технологиям.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Микрофлюидная система позволяет в реальном времени регистрировать кинетику адгезии клеток крови к белковой поверхности в обогащенной тромбоцитами плазме и цельной крови в условиях контролируемого потока.
2. В результате взаимодействия образцов крови с поверхностью, покрытой коллагеном I типа, в микрофлюидной системе в условиях потока, образуются белково-клеточные структуры, которые состоят из тромбоцитов и фактора фон Виллебранда с многочисленными включениями лейкоцитов.
3. Исследование кинетики адгезии клеток крови к фибриногену при высоких скоростях сдвига в образцах цельной крови позволяет выявлять нарушения гемостаза у больных с синдромом Heyde.
4. Изучение адгезии клеток крови к фибриногену в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови при скоростях сдвига, характерных для коронарных артерий, позволяет исследовать нарушения гемостаза у больных с ишемической болезнью сердца.
5. Оценка адгезии клеток крови к фибриногену в условиях потока в образцах цельной крови позволяет выявлять нарушения гемостаза у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

### **Внедрение результатов работы**

Основные результаты исследования внедрены в практику лаборатории клеточного гемостаза НИИЭК ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность и обоснованность выводов, полученных в результате исследования, подтверждены изучением значительного объема научной литературы, использованием соответствующей методологии, также тщательным анализом данных, собранных в процессе диссертационного исследования. Материалы и основные положения диссертации докладывались и обсуждались на объединенном Международном Конгрессе «Проблемы тромбоза и гемостаза 2018», г. Санкт-Петербург и IX Всероссийской Конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии СОИТН'18; Санкт-Петербург, октябрь 2018 г.; на V Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Наследственная и приобретенная патология свертывания крови - тромбозы и кровотечения: диагностика, профилактика, лечение, экономика», Саратов 2020 г.; на ежегодном Российском национальном конгрессе кардиологов 2019 г., 2020 г.; на ежегодном конгрессе Европейского общества кардиологов (ESC Congress) 2019 г., 2020 г.; на ежегодном конгрессе Европейского общества атеросклероза (EAS Congress) 2020 г (устный доклад); на ежегодном конгрессе Европейского общества гематологов (EHA Virtual congress) 2021 г.

### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертационного исследования опубликовано 21 научная работа, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАКом для публикации результатов диссертационных исследований (2 в международных журналах), 1 глава в монографии и 2 патента на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 112-ти страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Список литературы включает 6 отечественных и 143

зарубежных источников. Текст диссертации иллюстрирован 26-ю рисунками и содержит 1 таблицу.

# ГЛАВА 1. РОЛЬ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА В ГЕМОСТАЗЕ. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА. МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Фактор фон Виллебранда в гемостазе, его структура и функции

### История открытия фактора фон Виллебранда

Фактор фон Виллебранда - это большой мультимерный гликопротеин плазмы крови и субэндотелиального матрикса, который так же присутствует в эндотелиальных клетках в тельцах Вейбеля-Паладе (тельца ВП) и тромбоцитах ( $\alpha$ -гранулы) [20]. Этот белок был назван в честь финского врача Эрика фон Виллебранда, который в 1924 году начал изучать наследственное нарушение свертываемости крови, которое наблюдал в кровнородственных семьях на архипелаге Аландских островов в Балтийском море. Фон Виллебранд отличал это состояние от тромбоцитопенической пурпуры и других известных в то время гемофилий, в том числе от гемофилии А (дефицит фактора свертывания VIII), а также от тромбостении Гланцмана (дефицит интегрин тромбоцитов  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ). В своей первой работе, в 1926 году, он назвал это состояние псевдогемофилией [21]. В то время Эрик фон Виллебранд не смог определить, в чем была причина этих кровотечений, было ли это вызвано дефектом тромбоцитов, компонентов факторов свертывания крови или сосудов [22].

Сегодня состояние, описанное Э. фон Виллебрандом, называют болезнью Виллебранда (БВ). В середине 1950-х годов было показано, что у пациентов с БВ в плазме крови снижена концентрация фактора свертывания VIII (FVIII) [23]. Склонность к кожно-слизистым кровотечениям и дефицит фактора свертывания VIII корректировались путем переливания препарата фактора свертывания VIII, что указывало на то, что БВ была обусловлена дефицитом белка плазмы крови. Примечательно, что эти состояния корректировались также переливанием аналогичного препарата, полученного от пациентов с тяжелой гемофилией [24, 25]. Это стало первым доказательством наличия гемостатического «фактора фон

Виллебранда», отличного от FVIII и других факторов свертывания крови. ФВ был впервые очищен и выделен в начале 1970-х годов, а его полная последовательность была описана в 1986 году [22]. В последние десятилетия произошел значительный прогресс в понимании процесса биосинтеза ФВ, его структурных особенностей и молекулярных основ болезни Виллебранда. Также была предложена новая модель процесса свертывания крови, благодаря которой роль фактора фон Виллебранда в гемостазе стала значимее.

### **Модели свертывания крови и положение фактора фон Виллебранда в них**

С начала изучения процесса гемостаза, на протяжении нескольких лет не существовало модели, которая могла бы объяснить процессы с участием факторов свертывания крови, приводящих к остановке кровотечения. Важным шагом на пути к современному пониманию процесса гемостаза была публикация в 1964 году двух независимых работ Davie E. W. [26] и Macfarlane R. G. [27]. Они предложили две модели свертывания крови: «водопад» и «каскад» («водопад/каскад»), описывающие последовательность активации и взаимодействия факторов свертывания крови (рис. 1). Позже в эту модель были внесены дополнения и изменения, а именно, были описаны внешний путь – путь тканевого фактора (ТФ) и внутренний (контактный) пути активации тромбина. Модель «водопад/каскад» [28] сыграла решающую роль в понимании процесса коагуляции *in vitro*.

Однако, на момент этих публикаций и на протяжении последующих нескольких лет ФВ в эту модель коагуляции не входит, так как только в 1971 году Zimmerman с соавт. [29, 30] продемонстрировали, что FVIII и ФВ — это разные белки. Но уже в модели «водопад/каскад» ФВ служит переносчиком FVIII в кровотоке (рис. 1). FVIII немедленно участвует во внутреннем пути активации тромбина, взаимодействуя с активированным фактором свертывания IXa (FIXa) в качестве кофактора с образованием внутренней теназы (ферментный комплекс, который расщепляет неактивный фактор свертывания X в активный Xa). FVIII необходим для нормального гемостаза – его дефицит приводит к гемофилии А. В отсутствии ФВ FVIII нестабилен и подвержен быстрой деградации. ФВ

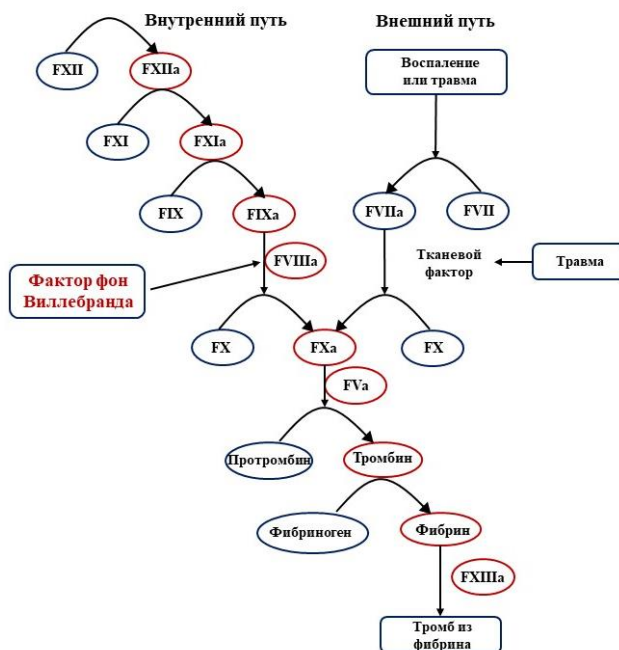
значительно продлевает период полужизни и защищает FVIII от протеолиза, в конечном итоге доставляя его к участкам повреждения сосудов [31].

Благодаря модели «водопад/каскад» были созданы плазменные тесты (например, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПТВ), тромбиновое время (ТВ)), позволяющие определить нарушения во внутреннем, внешнем и общем путях коагуляции [28]. Эти тесты для оценки состояния коагуляционного гемостаза используются и сегодня. Однако эта модель не совсем точно отражает функционирование системы коагуляции. Модель «водопад/каскад» описывает этапность процесса свертывания *in vitro*, но не объясняет его *in vivo*. На сегодняшний день были выявлены аргументы, ставящие под сомнение «водопад/каскадную» модель гемостаза [32]. Во-первых, низкие значения фактора свертывания XII (FXII) не приводят к развитию кровотечений. Во-вторых, при гемофилии А внешний путь коагуляции не способен компенсировать дефицит FVIII. В-третьих, у пациентов с гемофилией В (дефицит FIX) наблюдаются множественные кровотечения, хотя внешний путь коагуляции не затронут. В-четвертых, низкое количество FVII плазменного фактора вызывает кровотечения несмотря на то, что внутренний путь коагуляции по-прежнему функционирует.

Найденные недостатки модели «водопад/каскад» привели к тому, что в 2001 году Hoffman, M. с соавт. предложили «клеточную» модель гемостаза [32]. «Клеточная» модель основана на том, что взаимодействие ТФ лейкоцитов и других экспрессирующих его клеток (гладкомышечные клетки сосудов, адвентициальные клетки, перициты и т.д.) с FVII, запускает процесс коагуляции, приводящий в конечном итоге к образованию фибрина. На сегодняшний день нет однозначного мнения о том, сколько стадий включает в себя данная модель гемостаза, так как не все авторы описывают в «клеточной» теории механизмы, препятствующие дальнейшему распространению процесса тромбообразования. Hoffman, M. с соавт. первоначально описали три перекрывающиеся стадии «клеточной» модели гемостаза: *инициация, усиление и распространение* [33]. Описание процессов, препятствующих тромбообразованию вне поврежденного участка сосуда, они не



выделили в отдельную стадию. Однако, сегодня отдельные авторы относят эти процессы к отдельной стадии – терминации [34].



**Рисунок 1.** Модель гемостаза «водопад/каскад» [26, 27]. Фактор фон Виллебранда – переносчик FVIII в кровотоке. FV – фактор свертывания V (FVa – активированный фактор свертывания V), FVII – фактор свертывания VII (FVIIa – активированный фактор свертывания VII), FVIII – фактор свертывания VIII (FVIIIa – активированный фактор свертывания VIII), FIX – фактор свертывания IX (FIXa – активированный фактор свертывания IX), FX – фактор свертывания X (FXa – активированный фактор свертывания X), FXI – фактор свертывания XI (FXIa – активированный фактор свертывания XI), FXII – фактор свертывания XII (FXIIa – активированный фактор свертывания XII).

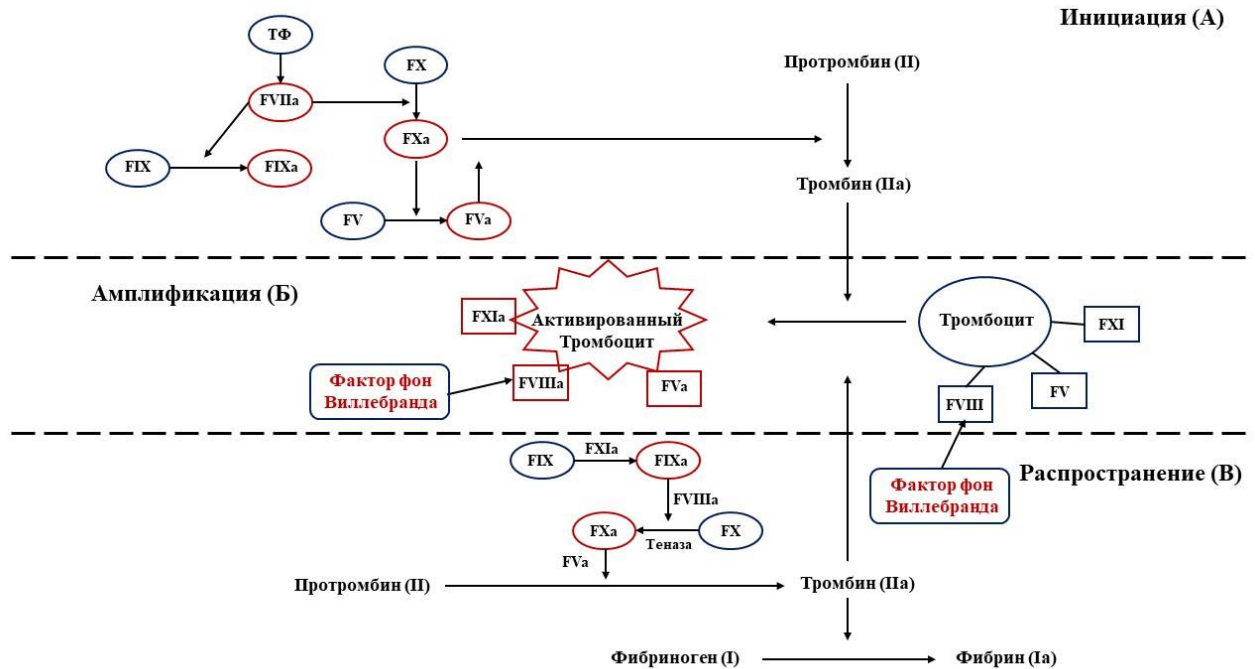
«Клеточная» модель (рис. 2), включающая разнообразную и сложную сеть факторов, позволяет лучше понимать и определять параметры, необходимые для адекватного образования тромбина, катализирующего переход фибриногена в фибрин. Согласно «клеточной» концепции гемостаза, *инициация* коагуляции (рис. 2А) происходит при взаимодействии крови с ТФ, экспрессируемого на клетках. Затем ТФ связывается с FVII, активируя его. Если стимул достаточно сильный, активируются дополнительные факторы свертывания, что приводит к образованию небольшого количества тромбина, образующегося в результате ферментативного расщепления протромбина. Однако небольших количеств тромбина,

образующегося на этой стадии, недостаточно для превращения фибриногена в фибрин и для стабилизации фибринового сгустка с помощью фактора свертывания VIII (FVIII). Во второй фазе процесса коагуляции, *амплификации* (рис. 2Б), тромбин активирует тромбоциты, которые затем предоставляют свою тромбогенную поверхность из отрицательно заряженных фосфолипидов. Здесь процесс коагуляции катализируется и, таким образом, усиливается. Тромбин активирует дополнительные факторы свертывания, которые связываются с активированными поверхностями тромбоцитов и значительно увеличивают образование тромбина в фазе *распространения* процесса свертывания (рис. 2В). Образование большого количества тромбина, создаваемое этими механизмами, приводит к обширной стимуляции гемостаза и достаточно для преобразования фибриногена в фибрин для стабилизации сгустка.

«Клеточная» модель гемостаза демонстрирует, что внешний и внутренний пути активации тромбина являются параллельными процессами, происходящими на клеточных поверхностях, а не дублирующими путями, как предлагала модель «водопад/каскад». Для эффективного процесса свертывания крови и формирования тромба необходимо, чтобы тромбин генерировался непосредственно на поверхности активированного тромбоцита, а не только на поверхности клетки, экспрессирующей ТФ [35]. Таким образом, тромбоциты не только участвуют в активации факторов свертывания крови, но и регулируют весь процесс коагуляции. Стоит отметить, что «клеточная» модель коагуляции способствует лучшему пониманию процесса свертывания крови в условиях потока. «Клеточная платформа» необходима для сборки коагуляционного комплекса, то есть для активации факторов свертывания крови точно в месте повреждения сосуда, не позволяя потоку крови уносить их в другое место.

Современная «клеточная» концепция также позволяет лучше понимать роль фактора фон Виллебранда в процессе гемостаза. Считается, что реакции, ответственные за инициирование коагуляции постоянно происходят вне кровеносных сосудов здоровых людей. Было доказано, что факторы свертывания

крови, включая FVII, FX и протромбин, способны покидать сосудистое русло, так как они были обнаружены в лимфе.



**Рисунок 2.** «Клеточная» модель гемостаза [32]. А – фаза инициации, Б – фаза амплификации, В – фаза распространения. Фактор фон Виллебранда, переносит и защищает от деградации FVIII и опосредует адгезию тромбоцитов к внеклеточному матриксу в месте повреждения сосуда, где они взаимодействуют с клетками, экспрессирующим ТФ. FV – фактор свертывания V (FVa – активированный фактор свертывания V), FVII – фактор свертывания VII (FVIIa – активированный фактор свертывания VII), FVIII – фактор свертывания VIII (FVIIIa – активированный фактор свертывания VIII), FIX – фактор свертывания IX (FIXa – активированный фактор свертывания IX), FX – фактор свертывания X (FXa – активированный фактор свертывания X), FXI – фактор свертывания XI (FXIa – активированный фактор свертывания XI), FXII – фактор свертывания XII (FXIIa – активированный фактор свертывания XII).

Рисунок заимствован [36] и модифицирован.

Количество каждого фактора свертывания вне сосуда в первую очередь зависит от размера молекулы [34]. На основании этих наблюдений было высказано предположение, что фаза инициации остается постоянно активной, с небольшими количествами активированных факторов свертывания, производимых на исходном

уровне. Следовательно, небольшие количества тромбина и активного ТФ постоянно вырабатываются вне сосудистого русла, независимо наличия от сосудистого повреждения. Таким образом, гемостатический процесс переходит в фазу амплификации только при повреждении сосудистой стенки. ФВ опосредует адгезию тромбоцитов к внеклеточному матриксу в месте повреждения сосуда, где они взаимодействуют с клетками, экспрессирующим ТФ [34].

### **Ген и доменная структура фактора фон Виллебранда**

Ген фактора фон Виллебранда локализован в коротком плече 12-й хромосомы (12p13.2) [37]. Так же в длинном плече 22 хромосомы присутствует частичный псевдоген ФВ (22q11.2) [38]. Псевдоген дублирует часть последовательности гена ФВ с гомологией 97% и вносит вклад в спектр мутаций, приводящих к развитию болезни Виллебранда, за счет генной конверсии.

В 2012 году Zhou Y. с соавт. пересмотрели доменную структуру ФВ, которая впервые была описана в 80-х годах [39]. Они представили обновленную последовательность доменов ФВ на основе наблюдаемых с помощью методов электронной микроскопии структур в виде: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (рис. 3) [40]. Домены А (А1, А2, А3) выглядят как глобулярные структуры, с гидрофобным ядром, и имеют основные функциональные сайты связывания с лейкоцитами, тромбоцитами, коллагеном (рис. 3). Домен А1, в основном, связывается с GPIb рецептором тромбоцитов, также он может взаимодействовать с коллагенами I, IV, VI типов и гепарином. Домен А2 имеет сайт связывания с ADAMTS-13. Так же он участвует в само-ассоциации молекул ФВ. Главный сайт связывания для коллагенов находится в домене А3. Домен С4 имеет RGD (Arg-Gly-Asp) участок для взаимодействия с  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GP IIb/IIIa) тромбоцитов. D'D3 домен связывает FVIII. С – концевой домен «цистеиновый узел» (СТСК) участвует в димеризации мономеров ФВ. Домены С удлиняют и обеспечивают гибкость молекуле ФВ, что является важным фактом для его функционирования при различных напряжениях сдвига в потоке. Домены D принимают участие в димеризации и образовании дисульфидных связей димеров ФВ в длинные, характерные для телец ВП. ФВ связывает лейкоциты через

взаимодействие A1 домена с гликопротеиновым лигандом Р-селектина (PSGL-1), D'D3 и A1, A2, A3 доменов с  $\beta$ -2 интегринами.



**Рисунок 3.** Схема доменной структура мономера фактора фон Виллебранда (ФВ) на основе данных Zhou Y. с соавт., 2012 год [40].

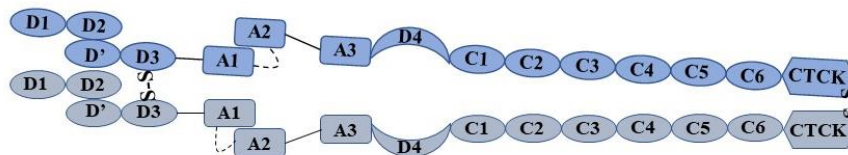
### Биосинтез и процессинг фактора фон Виллебранда

ФВ синтезируется в эндотелиальных клетках и мегакариоцитах в виде препро-ФВ молекулы. После синтеза молекула препро-ФВ, состоящая из 2813 аминокислот (АК), включая сигнальный пептид из 22-х АК, пропептид из 741-х АК и зрелую субъединицу из 2050 АК [41], подвергается серии посттрансляционных модификаций, включая димеризацию, гликозилирование, сульфатирование и, в конечном итоге, мультимеризацию. После всех посттрансляционных изменений мультимеры ФВ либо секретируются в кровоток, либо депонируются в специализированных органеллах: тельцах ВП эндотелиальных клеток или в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов [42].

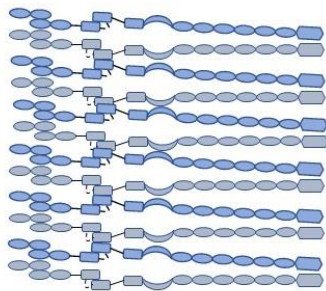
После синтеза полипептид препро-ФВ подвергается процессу димеризации через образование дисульфидных связей между «цистеиновыми узлами» С-концевых доменов (CTCK) по типу «хвост к хвосту» (рис. 4А) в эндоплазматическом ретикулуме. Затем димеры молекул ФВ собираются в спирали, которые соответствуют каналам телец ВП [43]. Близкое расположение соседних D'D3 доменов в спиральях способствует образованию между ними дисульфидных связей в аппарате Гольджи. Так же пропептид, состоящий из D1-D2

доменов, отщепляется в присутствии фурина, но остается ковалентно связанным с D'D3 доменом (рис. 4Б) [44]. Таким образом, дисульфидные связи N-N D3-D3 и C-C CTCK-CTCK располагаются по типу по спирали «свернутой веревки» вокруг оси каналца ФВ (рис. 4В). С-концевая часть (A1-СК), в виде «димерных букетов» каждой молекулы ФВ не упорядочена в каналцах. Однако трубочки в тельцах ВП очень плотно упакованы, что не позволяет «димерным букетам торчать» в стороны. Вероятно, такое расположение С-концевой части молекулы ФВ определяет регулярное расстояние между каналцами, которые характеризуют электронно-микроскопическое изображение телец ВП [45]. Подобным образом, в виде трубчатых структур, молекулы ФВ организованы и в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов, но размер этих трубочек меньше, чем в тельцах ВП [43, 46].

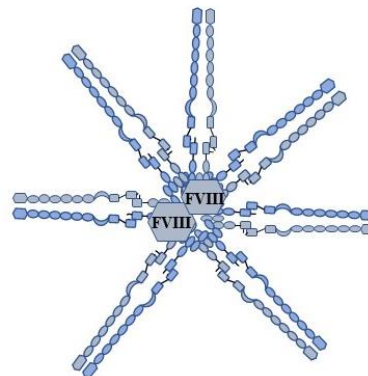
А. «Димерный букет» фактора фон Виллебранда



Б. Мультимер фактора фон Виллебранда



В. Мультимер фактора фон Виллебранда (поперечный срез)



**Рисунок 4.** Мультимеризация молекул фактора фон Виллебранда (ФВ) в процессе биосинтеза. **А** - «Димерный букет». **Б** – Мультимер фактора фон Виллебранда, собранный из «димерных букетов». **В** – Мультимер фактора фон Виллебранда, собранный по спирали по типу «свернутой веревки» вокруг оси каналца ФВ. В оси каналца ФВ фактор свертывания FVIII связан с доменом D3.

Процесс гликозилирования – один из важных посттрансляционных процессов, происходящих во время мультимеризации молекулы ФВ. Наличие

различных видов гликанов определяется типом клетки. В эндотелиальных клетках после аппарата Гольджи ранее добавленные N-связанные гликаны подвергаются дальнейшему процессингу с добавлением детерминант групп крови по системе ABO, как определено ABO генотипом [47]. По некоторым данным известно, что в тромбоцитах наблюдается меньшее N-связанное гликозилирование и что в них не добавляются детерминанты групп крови ABO [41]. Конечным результатом этого дифференциального гликозилирования является то, что ФВ тромбоцитарного происхождения более устойчив к протеолизу ADAMTS-13, чем ФВ плазмы крови [48].

### **Хранение и высвобождение молекул фактора фон Виллебранда**

Фактор фон Виллебранда существует в различных размерах, называемые мультимерами ФВ, и включает формы с низкой (НМФВ), средней (СМФВ), высокой (ВМФВ) и сверхбольшой (УВМФВ) молекулярной массой. Уникальная способность ФВ к мультимеризации критически важна для понимания сути болезни Виллебранда (БВ), так как мультимерная структура коррелирует с функцией ФВ. Из всех мультимеров ФВ высокомолекулярный ФВ (ВМФВ) обладает наибольшей эффективностью в осуществлении нормального гемостаза (связывающей способностью к коллагену и рецепторам тромбоцитов GP Ib и IIb/IIIa и агрегации тромбоцитов в условиях высоких скоростей сдвига) [29]. ФВ, депонированный в тельцах ВП эндотелиальных клеток и  $\alpha$ -гранулах мегакариоцитов, представлен, в основном, УВМФВ мультимерами. Секреция содержимого телец ВП и  $\alpha$ -гранул тромбоцитов происходит двумя путями: индуцированным и конститутивным [20].

Из эндотелиальных клеток сразу после синтеза, конститутивно секретятся 95% мультимеров ФВ (НМФВ, СМФВ и ВМФВ). Индуцировано из телец ВП секретятся сверхбольшие мультимеры ФВ (УВМФВ). Для регуляции высвобождения содержимого телец ВП существует ряд физиологических и фармакологических агентов, таких как адреналин, аденозиндифосфат (АДФ), коллаген, фибрин, гистамин, тромбин, белки-компоненты комплемента и десмопрессин (синтетический аналог вазопрессина) [49]. В физиологических

условиях количество ФВ в плазме крови резко повышается в следствии адренергического стресса, образования тромбина или после введения препарата десмопрессина. Вероятно, повышение концентрации ФВ в плазме опосредовано его высвобождением из телец Вейбеля-Палада. В работе Richardson M. с соавт. с помощью методов электронной микроскопии было продемонстрировано, что в ответ на действие тромбина происходит «потеря» телец ВП эндотелиальными клетками [50]. Способность десмопрессина повышать ФВ в плазме крови сделала его основным препаратом для лечения БВ и гемофилии [14].

Высвобождение содержимого  $\alpha$ -гранул тромбоцитов происходит только по индуцированному пути после их активации с участием таких агонистов, как тромбин, АДФ, PAR-1 и PAR-4 (протеаза - активирующие рецепторы 1 и 4) агонисты [51]. В  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов содержится 15-20% мультимеров ФВ от его общего количества. Относительный вклад ФВ в гемостаз из эндотелиальных клеток или тромбоцитов в настоящее время является предметом исследования. Возможно, ФВ, высвобождаемый из тромбоцитов, может опосредовать развитие тромбоза, но не участвовать в процессе первичного гемостаза [52]. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что тромбоцитарный ФВ может усугублять такие заболевания, как инсульт [53].

### **Влияние гидродинамических сил на конформацию и размер мультимеров фактора фон Виллебранда**

ФВ существует в кровотоке в одной из двух конформаций - глобулярной и фибриллярной [6]. Конформация ФВ зависит от скорости сдвига кровотока ( $\gamma$ ) в сосудах. В условиях низких скоростей сдвига (например, в венах, где  $\gamma = 15 - 200 \text{ с}^{-1}$ , или в крупных артериях, где они  $\gamma = 300 - 800 \text{ с}^{-1}$ ) ФВ представлен в глобулярной форме, которая скрывает сайты связывания и не взаимодействует с циркулирующими тромбоцитами. В случае повреждения сосуда и при высоких скоростях сдвига (например, в интактных мелких артериях и артериолах, где  $\gamma = 450 - 1\,600 \text{ с}^{-1}$ , а на участках с атеросклеротическими бляшками  $\gamma$  может достигать  $11\,000 \text{ с}^{-1}$  и даже выше), ФВ разворачивается и открывает сайты связывания, в частности, для GP Ib рецепторов тромбоцитов (рис. 5). Изменение конформации



молекулы ФВ происходит при достижении скорости сдвига порогового значения  $5\ 000\ \text{с}^{-1}$  [6]. Механо-чувствительным элементом молекулы ФВ является домен А2. Его особенная вторичная и третичная структура позволяют осуществлять конформационный переход под действием гидродинамических сил, который далее передается на А1 и последующие домены [54, 55]. ФВ активируется под действием сил сдвига не только в суспензии, но и при взаимодействии с коллагеном субэндотелиального матрикса кровеносных сосудов [56].

Фактор фон Виллебранда высвобождается в кровоток в виде сверхбольших мультимеров (УВМФВ). Сверхбольшие мультимеры чрезвычайно реактивны и гиперадгезивны. Они склонны к взаимодействию с тромбоцитами, вызывая спонтанную адгезию и агрегацию тромбоцитов, связывая GP Ib на тромбоцитах. Поэтому сразу после секреции молекулы ФВ подвергаются протеолизу металлопротеиназой ADAMTS-13 (дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом 1-го типа, 13) [52]. ADAMTS-13 является плазменной пептидазой, которая расщепляет циркулирующий ФВ между аминокислотами Tyr 1605 и Met 1606 в домене А2 до более коротких, менее гемостатически активных мультимеров. Для «разрезания» сверхбольшого мультимера ФВ ADAMTS-13 необходимо, чтобы фактор фон Виллебранда развернулся в потоке и обнажил сайт расщепления в домене А2 [57]. Важно отметить, что для выполнения своих функций ADAMTS-13 также нуждается в конформационном изменении. Было показано, что активация ADAMTS-13 происходит при его взаимодействии с D4-СК фрагментом молекулы ФВ [58]. Нарушение баланса между активностью ADAMTS-13 и протеолизом ФВ может привести к ряду патологических состояний. Врожденный или приобретенный дефицит ADAMTS-13 может привести к тромботической тромбоцитопенической пурпуре (ТТП) [59]. С другой стороны, усиленный протеолиз мультимеров ФВ может вызывать клинически значимые кровотечения. Например, мутантный ФВ, который присутствует при БВ типа 2А, имеет повышенную чувствительность к расщеплению ADAMTS-13, что приводит к потере больших мультимеров ФВ [60].

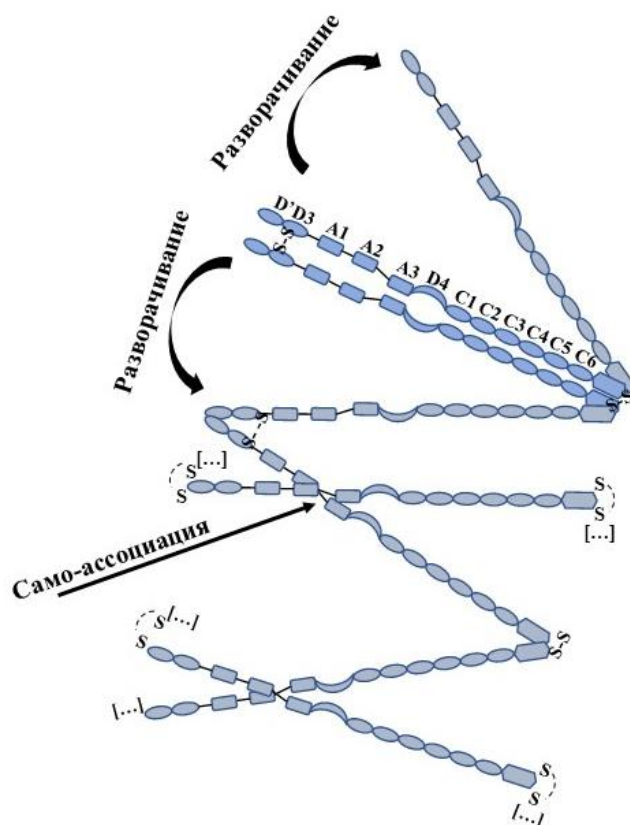
Аналогичное состояние наблюдается при приобретённом синдроме Виллебранда, которая является частью синдрома Heyde [61].

Еще одним важным механизмом в регуляции размера мультимеров ФВ, а следовательно, и его функции, является процесс само-ассоциации молекул ФВ (рис. 5). Конформационные изменения домена А2 способствуют гомотипическому взаимодействию между молекулами ФВ [62]. Процесс само-ассоциации позволяет фактору фон Виллебранда создавать сети, где один тромбоцит через рецептор GP Ib связывает больше одной молекулы ФВ (рис. 5). Также сети из ФВ не подвергаются расщеплению протеазой ADAMTS-13. Механо-чувствительный домен А2 является точкой баланса в регуляции размера мультимеров ФВ: уменьшение размера ФВ посредством протеолиза ADAMTS-13 и увеличение размера с помощью процесса само-ассоциации. Регулирующим фактором, по-видимому, в разделении этих путей является  $Ca^{2+}$ . Снижение уровня  $Ca^{2+}$  способствует смещению баланса в сторону процесса само-ассоциации мультимеров ФВ [62].

Таким образом, функциональное состояние молекул фактора фон Виллебранда зависит от двух значимых механизмов: влияние гидродинамических сил условий потока крови и изменение размера мультимеров ФВ. Развернутый ФВ открывает участки связывания с тромбоцитами, лейкоцитами и коллагенами. Фактор фон Виллебранда выполняет три основные функции: опосредование адгезии тромбоцитов к месту повреждения сосудистой стенки, связывание и защита FVIII и рекрутирование лейкоцитов для их последующей экстравазации. Помимо этих основных функций, ФВ является переносчиком в кровотоке некоторых белков (остепротегерин, ангиопоэтин-2, галектины 1 и 3), участвует в ангиогенезе, а также пролиферации гладкомышечных клеток [63].

Важно отметить, что «разворачивание» молекулы ФВ может происходить не только под действием сил сдвига, а также и в статических условиях при взаимодействии некоторых молекул с доменом А1 ФВ. Такими молекулами являются антибиотик ристоцетин и яд некоторых змей – ботроцетин. Химических сил при взаимодействии этих агентов с доменом А1 достаточно для того, чтобы

развернуть молекулу ФВ [54]. Ристоцетин в настоящее время используется в лабораторных тестах для оценки функционального состояния ФВ.



**Рисунок 5.** Схематическое изображение регуляции размера молекулы фактора фон Виллебранда под действием гидродинамических сил. При высоких скоростях сдвига ФВ разворачивается и открывает сайты связывания для тромбоцитов, лейкоцитов, белков и факторов свертывания. В то же время, благодаря механизму трехмерного обмена, развернутые димеры могут взаимодействовать друг с другом, то есть происходит процесс само-ассоциации. Рисунок был заимствован у Lancellotti, S. с соавт. [54] и модифицирован.

## 1.2 Патологии, ассоциированные с фактором фон Виллебранда

В нормальных условиях молекулы ФВ и тромбоциты циркулируют в кровотоке, не взаимодействуя друг с другом. Этот тонкий баланс регулируется концентрацией ФВ и размером его молекул, скоростью сдвига в кровотоке и протеолитической активностью ADAMTS-13. При сдвиговом потоке сила, действующая на молекулу фактора фон Виллебранда, увеличивается пропорционально квадрату длины мультимера ФВ [64]. Таким образом,

обеспечивая эффективный механизм гемостатической регуляции распределения мультимеров ФВ по размерам за счет разворачивания его молекул и расщепления в домене A2 посредством ADAMTS-13. Расщепленный ФВ (ВМФВ) активируется гидродинамическими силами, соответствующие артериальному руслу, чтобы обеспечить гемостаз, тогда как нерасщепленный ФВ (СВМФВ) активируется при более низких физиологических скоростях сдвига и вызывает тромбоз.

Нарушение этого баланса за счет изменений в каких-либо элементах могут приводить к геморрагическим нарушениям (болезнь Виллебранда, приобретенный синдром Виллебранда) или тромботическим нарушениям (тромботическая тромбоцитопеническая пурпура). Высокие уровни ФВ в плазме могут быть одним из факторов риска тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. Нарушение соотношения плазменных уровней ФВ и ADAMTS-13 у пациентов с новой коронавирусной инфекцией приводит к развитию тяжелой формы заболевания и тромбоэмболических осложнений.

### **Болезнь Виллебранда**

Наиболее распространённая патология, развивающаяся вследствие качественного и количественного нарушения фактора фон Виллебранда – болезнь Виллебранда (БВ). БВ – наиболее частое нарушение свертываемости крови. Частота распространения БВ в популяции достигает 1 % [60]. Значительные симптомы кровотечения из-за снижения ФВ в плазме были зарегистрированы примерно у одного человека из 1000 [60]. Распространенность БВ относительно постоянна среди разных рас и этнических групп. Постановка диагноза БВ сложный и не всегда простой процесс. Трудности с диагностикой связаны с вариабельностью фенотипа кровотечения, вариабельностью уровней ФВ и классификацией заболевания по широкому спектру подтипов. Диагностический подход к БВ основан на двух основных аспектах: оценка истории кровотечений и анамнеза для оценки тяжести фенотипа кровотечений и лабораторные методы определения концентрации и активности связывания тромбоцитов и ФВ, а также активности FVIII.

Современная классификация БВ, предложенной Международным обществом по тромбозу и гемостазу (ISTH) в 2006 году включает 3 типа БВ: тип 1 – частичный количественный дефицит ФВ, тип 2 – качественные отклонения в структуре ФВ, тип 3 – почти полное отсутствие ФВ с очень низким уровнем FVIII. БВ типа 2 подразделяется на 4 подтипа: тип 2А характеризуется снижением или отсутствием высокомолекулярного ФВ, тип 2В характеризуется усилением функции ФВ, при которой увеличивается его сродство к тромбоцитам, тип 2М характеризуется снижением связывающей функции ФВ с тромбоцитами или коллагеном, а тип 2N характеризуется уменьшением связывающей функции ФВ с FVIII [65]. В 2021 году в рамках этой классификации была добавлена БВ типа 1С, при которой происходит повышенный клиренс ФВ, что также сказывается на его гемостатической функции [66].

БВ характеризуется чрезмерными кожно-слизистыми кровотечениями, например, носовым кровотечением, длительным кровотечением из мелких ран и полости рта, желудочно-кишечным кровотечением. Кровотечения в полость суставов развиваются в более тяжелых случаях, у пациентов с БВ типа 3, поскольку они также связаны с тяжелым дефицитом фактора свертывания VIII [67]. При БВ типа 2 и 3 также описаны ангиодисплазии желудочно-кишечного тракта [9].

Диагностика БВ основывается, в первую очередь, на клинических симптомах, с использованием лабораторных тестов: определение активности фактора фон Виллебранда и его количества, а также активности фактора VIII. Более специализированные лабораторные методы позволяют классифицировать БВ по различным типам и подтипам, что подразумевает разные стратегии терапии. Лечение БВ основано на повышении концентрации ФВ в плазме, которая достигается тремя основными подходами. Это заместительная терапия ФВ и FVIII, полученных из плазмы здоровых добровольцев, терапия десмопрессинном (синтетический аналог вазопрессина, стимулирующего высвобождение молекул ФВ из эндотелиальных клеток) и в 2015 году к использованию был одобрен рекомбинантный ФВ [68].

### **Приобретенный синдром Виллебранда. Синдром Heyde.**

Помимо наследственной болезни Виллебранда существует приобретенный синдром Виллебранда, впервые описанный в 1968 году Simone, J. V. с соавт. [69]. В отличие от БВ приобретенный синдром Виллебранда возникает у взрослых пациентов без кровотечений в личном или семейном анамнезе и часто ассоциируется множеством основных заболеваний, таких как, лимфо-, миелопролиферативные и сердечно-сосудистые заболевания. Несмотря на то, что приобретенный синдром Виллебранда был описан более 50-ти лет назад, в последнее десятилетие он вновь привлекает большое внимание из-за его связи с относительно частыми сердечно-сосудистыми заболеваниями, включая врожденные пороки сердца, стеноз клапана аорты и использования вспомогательных устройств левого желудочка.

Из-за отсутствия крупных проспективных исследований фактическая распространенность приобретенного синдрома Виллебранда в общей популяции остается неопределенной. В период с 1998 по 1999 год был проведен ретроспективный опрос, который был опубликован в качестве официального сообщения Комитета по науке и стандартизации международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH-SSC), в котором описана информация о случаях в регистре ISTH-SSC [70]. Распространенность приобретенного синдрома Виллебранда, вероятно, недооценена, потому что немногие врачи ищут патологию ФВ среди пациентов с гематологическими, не говоря уже о иммунологических или сердечно-сосудистых заболеваниях.

Приобретенный синдром Виллебранда приводит к тяжелым кровотечениям не только из-за снижения количества ФВ, но также из-за сопутствующего снижения FVIII. Спектр кровотечений варьируется от кровотечений в слизистые оболочки, включая носовые кровотечения, кожные гематомы, гематурию и желудочно-кишечные кровотечения, до суставных и мышечных кровотечений [71]. Связь между приобретённым синдромом Виллебранда и желудочно-кишечным кровотечением хорошо была описана при синдроме Heyde в 1958 году. Долгое время считалось, что синдром Heyde развивается в следствии артериовенозных

мальформаций, в основном, в толстой кишке, позже при эндоскопических исследованиях выявили мелкие сосудистые сплетения в подслизистой оболочке кишечника [72]. Впоследствии было обнаружено, что клинические проявления синдрома Heyde эффективнее исчезают после замены аортального клапана, чем после резекции толстой кишки [72]. Позже, в 1992 году, Warkentin, Т. Е. с соавт. предположили, что основной причиной развития желудочно-кишечных кровотечений может быть приобретенный синдромом Виллебранда, развивающийся в следствии потери ВМФВ [73]. Также они выдвинули гипотезу, что механические факторы в месте стенозированного аортального клапана приводят к истощению высокомолекулярного ФВ. Было показано, что истощение высокомолекулярного ФВ усиливает васкуляризацию и ангиогенез [74], что может объяснить ангиодисплазию желудочно-кишечного тракта, наблюдаемую у пациентов с тяжелым стенозом клапана аорты и приобретенным синдромом Виллебранда.

По последним данным у 70 – 80 % пациентов с тяжелым стенозом клапана аорты наблюдается снижение высокомолекулярных мультимеров ФВ, однако желудочно-кишечные кровотечения (развитие синдрома Heyde) наблюдаются у 7 – 20 % людей [8]. Таким образом, синдром Heyde развивается в следствии тяжелого стеноза клапана аорты, потери ВМФВ и ангиодисплазии желудочно-кишечного тракта [75]. Причинами развития синдрома Heyde являются также гипертрофическая кардиомиопатия с обструкцией выносящего тракта левого желудочка, митральная регургитация и наличие вспомогательного устройства левого желудочка [76]. Эти сердечно-сосудистые патологии создают условия для высокоскоростных потоков, которые, в свою очередь, приводят к снижению количества ВМФВ за счет повышенного протеолиза металлопротеиназой ADAMTS-13 при сохранении массовой концентрации ФВ в плазме крови [8]. То есть происходит развитие приобретенной БВ типа 2А. В работе Casonato А. с соавт. продемонстрированы данные, что за приобретенной БВ 2А может скрываться ранее не диагностированная врожденная болезнь Виллебранда типа 2А [61].

Диагностика приобретенного синдрома Виллебранда у пациентов является сложной задачей. Это происходит из-за того, что клинические и лабораторные характеристики частично совпадают с признаками наследственной БВ, но у пациентов отсутствуют эпизоды кровотечения в личном или семейном анамнезе. Лабораторные тесты, используемые для диагностики приобретенного синдрома Виллебранда, аналогичны врожденной БВ, однако, наиболее важны – оценка мультимеров ФВ с помощью электрофореза, а также исследование плазмы на антитела к ФВ. Так как приобретенный синдром Виллебранда является следствием основного заболевания, важно точно диагностировать его. Лечение приобретенного синдрома Виллебранда зависит основного заболевания. Поэтому, в первую очередь необходимо корректировать первичную патологию. Например, при синдроме Heyde, транскатетерная трансплантация аортального клапана снижает проявление симптомом желудочно-кишечного кровотечения [75]. Также применяется симптоматическая терапия аналогичная при БВ, а именно, терапия, направленная на повышение ФВ в плазме и ингибирование фибринолиза. В последние годы разрабатываются потенциальные новые методы лечения приобретенного синдрома Виллебранда, ассоциированного с вспомогательными устройствами левого желудочка. Эти методы лечения основаны на ингибировании ADAMTS-13, например, введение моноклональных антител, блокирующих ADAMTS-13 [71].

### **Фактор фон Виллебранда и ишемическая болезнь сердца**

В многочисленных исследованиях была оценена взаимосвязь между уровнями ФВ в плазме и тромбоэмболическими осложнениям сердечно-сосудистых заболеваний [76-78]. В отличие от довольно слабой корреляции в общей популяции у пациентов с сосудистыми заболеваниями ФВ является значимым прогностическим фактором неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, включая смерть [79]. Аналогично, ФВ обычно повышается во время острого коронарного синдрома, и степень этого высвобождения ФВ в плазму крови является независимым предиктором неблагоприятного клинического исхода у таких пациентов.



В настоящее время плазменный количество ФВ в плазме считается маркером повреждения и дисфункции эндотелия артерий и влияет на патогенез ишемической болезни сердца (ИБС) [77]. Seaman C.D. с соавт. показали, что ИБС у пациентов с болезнью Виллебранда наблюдается реже. В регистровом исследовании, включающем 7.556 случаев, связанных с БВ, и 19.918.970 случаев, не связанных с БВ, ИБС реже встречалась у пациентов с БВ (15,0%), чем у пациентов без БВ (26,0%). После многофакторного логистического регрессионного анализа с поправкой на основные факторы риска ИБС, вероятность ИБС у пациентов с БВ осталась ниже, чем у пациентов без него [76]. Плазменные уровни ФВ также различаются у здоровых людей и пациентов с ИБС. У 110 пациентов (средний возраст  $58 \pm 20$  лет) с ИБС концентрация ФВ в плазме составляла  $141,78 \pm 20,53$  МЕ/дл, тогда как в контрольной группе здоровых добровольцев количество ФВ в плазме составляло  $111,95 \pm 17,15$  МЕ/дл [77]. В проспективном многоцентровом исследовании с участием 3043 пациентов со стабильной стенокардией или перенесенным инфарктом миокарда (ИМ) было показано, что более высокое количество ФВ в плазме коррелирует с увеличением частоты ИМ и внезапной сердечной смерти на 8,5% [78].

Патофизиологические данные свидетельствуют о том, что ФВ является не только маркером, но и эффектором в патогенезе инфаркта миокарда [80]. ФВ синтезируется и высвобождается эндотелиальными клетками сосудов в ответ на различные стимулы, связанные с острой ишемией, включая гипоксию, воспалительные цитокины, тромбин и адреналин. ФВ играет важную роль в процессе образования артериальных тромбов. ФВ критически важен для инициирования адгезии тромбоцитов и последующей агрегации, происходящей при высоких скоростях сдвига, соответствующим артериальному кровотоку.

### **Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура.**

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП) – это редкая и жизнеугрожающая тромботическая микроангиопатия, в основе которой лежит тяжелый дефицит специфической протеазы, расщепляющей фактор фон Виллебранда, ADAMTS-13. В основе болезни лежит резкое повышение агрегации

тромбоцитов с образованием тромбоцитарных (гиалиновых) тромбов, состоящих из тромбоцитов и фактора фон Виллебранда, в мелких сосудах большинства органов. В первую очередь происходит поражение головного мозга, почек и легких. Повышенное потребление тромбоцитов приводит к развитию тромбоцитопении, сужение просвета сосудов вызывает микроангиопатическую гемолитическую анемию (механическое разрушение эритроцитов), что приводит к ишемии важнейших органов.

Распространенность ТТП составляет примерно 10 случаев на 1.000.000 человек, а заболеваемость примерно 1 – 2 новых случая на 1.000.000 человек [81]. Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура классифицируется на две большие группы: наследственная или приобретенная. Наследственная ТТП встречается редко (5% от всех случаев ТТП) и вызывается рецессивными мутациями гена ADAMTS-13, приводящими к дефициту фермента. Приобретенная ТТП (95% от всех случаев ТТП) может иметь множество причин, однако, наиболее распространённая - наличие аутоантител против ADAMTS-13 [81].

Первый случай ТТП был описан Мошковицем в 1924 году у 16-летней девочки, у которой внезапно появились слабость, боль, бледность, жар и петехии [81]. В последние десятилетия был сделан ряд фундаментальных открытий, которые привели к прорыву в понимании механизма ТТП. В 1982 году Моаке с соавт. обнаружили сверхбольшие мультимеры ФВ в плазме крови у пациентов с ТТП; по размеру они соответствовали тем, что хранятся в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов и в тельцах ВП эндотелиальных клеток [82]. Гипотеза Моаке с соавт. объясняла присутствие сверхбольших мультимеров ФВ отсутствием протеазы, расщепляющих их. В 2001 году эта протеаза была выделена, очищена и идентифицирована как ADAMTS-13 [83].

Снижение активности ADAMTS-13 выявлено при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС-синдром), при циррозе печени, уремии, острых воспалительных заболеваниях, в послеоперационном периоде. Но во всех перечисленных случаях уровень активности ADAMTS-13 был выше 10 %. Крайне низкое значение этого показателя

(<10 %) специфично для ТТП, у большинства больных из этой группы определяются аутоантитела к ADAMTS-13. В последствии тяжелый дефицит ADAMTS-13 исследователями и клиницистами был включен в диагностику ТТП. Это положило начало разработки своевременных методов лечения пациентов с атипичными клиническими признаками, ранее не подходивших под диагноз ТТП. И, наоборот, исключение тяжелого дефицита ADAMTS-13 способствует диагностике и лечению других причин тромботической микроангиопатии, которые требуют другого терапевтического подхода [84].

Диагностика ТТП строится на выявлении снижения активности ADAMTS-13 – чувствительного и специфического маркера ТТП. Снижение активности ADAMTS-13 < 10 % является тяжелым дефицитом и, соответственно, основанием для постановки диагноза ТТП., наравне с оценкой уровней анти-ADAMTS-13 аутоантител в плазме крови и анализе гена, кодирующего ADAMTS-13 [81].

ТТП характеризуется крайне агрессивным течением и требует начала терапии уже в первые часы возникновения, при отсутствии адекватного оперативно назначенного лечения показатель летальность может достигать 100%. Терапия первой линии включает ежедневный плазмаферез с переливанием свежемороженой плазмы здоровых добровольцев и иммуносупрессию кортикостероидами. Часто к терапии первой линии добавляют цитотоксическую терапию гуманизированными моноклиальными антителами против CD20 (ритуксимаб), блокирующих выработку аутоантител против ADAMTS-13. Недавно появился препарат моноклональных антител против A1 домена ФВ (Каплацизумаб), применяемый в дополнение к заместительной терапии. Он блокирует взаимодействие между сверхбольшими мультимерами ФВ и тромбоцитами [85]. В последние годы исследуются возможность применения рекомбинантного ADAMTS-13 для лечения врожденной формы ТТП [86].

### **Роль фактора фон Виллебранда в развитии тромботических осложнений COVID-19**

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) способствует развитию спектра повреждений различных органов и систем. У некоторых пациентов

наблюдается тяжелое состояние с избыточным воспалительным ответом, которое может быть связано с коагулопатией и повреждением эндотелия [87]. Нарушения гемостаза при COVID-19 ассоциированы с риском летального исхода. Регулирующие органы здравоохранения разных стран и Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) рекомендуют использовать антикоагулянты (нефракционированный и низкомолекулярный гепарин) для профилактики тромботических и тромбоэмболических осложнений. Несмотря на то, что, согласно исследованиям, применение антикоагулянтов, как в терапевтических, так и в профилактических дозах снижает внутрибольничную смертность, эти результаты противоречивы из-за разных условий исследований, популяций и терапевтических подходов [88]. Анализ секционных данных пациентов, погибших от COVID-19, указывает на наличие множественных геморрагических повреждений в альвеолах, помимо диффузного повреждения самих альвеол. Также отмечаются признаки тромботической микроангиопатии в легких [89].

Выраженная связь между COVID-19 и коагулопатией может указывать на то, что существует несколько молекулярных путей, приводящих к развитию тромботических осложнений. Есть несколько потенциальных механизмов, которые могут объяснить связь между COVID-19 и коагулопатией на молекулярном и клеточном уровнях [90]. Тем не менее, необходимы дополнительные исследования, чтобы полученные данные способствовали поиску новых терапевтических подходов. Известно, что SARS-CoV2 использует для инфицирования клеток рецептор ангиотензин превращающего фермента – 2 (АПФ-2). Рецептор АПФ-2 превращает ангиотензин-2 в ангиотензин 1-7. Таким образом, взаимодействие вируса SARS-CoV2 с рецептором АПФ-2 может приводить к снижению превращения ангиотензин-2 в ангиотензин 1-7, что, соответственно, приводит к увеличению количества ангиотензина-2 и снижению ангиотензина 1-7 [90]. Стоит отметить, что, в то время как ангиотензин-2 обладает провоспалительным и протромботическим действием, ангиотензин 1-7 играет противовоспалительную и антитромботическую роль [91]. Рецептор АПФ-2 широко экспрессируется на эндотелиальных клетках, поэтому в механизм тромбоэмболических осложнений

вносит вклад не только прямое инфицирование вирусом SARS-CoV2, приводящее к дисфункции эндотелия., но и изменение соотношения между ангиотензином-2 и ангиотензином 1-7. Так же нарушение регуляции ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в сосудистой сети у пациентов с COVID-19 может инициировать каскад событий, которые приводят к усилению коагулопатии [90]. К гиперкоагуляции, по данным Ali с соавт., может приводить: оксидативный стресс, дисрегуляция иммунного ответа, активация системы комплимента, образование нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей, а также активация ФВ [90].

Механизм нарушения коагуляции у пациентов с COVID-19 с участием ФВ представляет особый интерес. Данные литературы свидетельствуют, что у пациентов с COVID-19 повышается количество ФВ в плазме, вследствие повреждения эндотелия, и снижается активность ADAMTS-13. Таким образом, уникальный механизм развития коагулопатии при COVID-19 развивается из-за нарушения соотношения ФВ/ADAMTS-13 [92-94]. Патогенез тромботических осложнений при COVID-19 может быть похож на патогенез тромботической тромбоцитопенической пурпуры, в основе которой также лежит нарушение соотношения ФВ/ADAMTS-13. Но при тяжелой форме COVID-19, несмотря на несколько путей участия оси ФВ/ADAMTS-13 в патогенезе коагулопатии, происходит изменение патогенеза ТТП. У тяжелых пациентов с COVID-19 повышается высвобождение сверхбольших мультимеров ФВ, вследствие прямого повреждения эндотелия коронавирусом SARS-CoV-2. Это приводит к повышению потребления протеазы ADAMTS-13 и его истощению. В результате, большое количество большого и сверхдлинного ФВ способствует образованию микротромбов [95]. Количественный дисбаланс между ФВ и ADAMTS-13 увеличивает состояние гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования участия ФВ в развитии коагулопатии у пациентов с COVID-19.

### **1.3 Лабораторные методы диагностики нарушений функции фактора фон Виллебранда**

Существующие на сегодняшний день лабораторные методы оценки фактора фон Виллебранда, в первую очередь, были разработаны для точной диагностики и классификации Болезни Виллебранда. Диагностика БВ начинается с оценки количества ФВ в плазме (антиген ФВ, ФВ:Аг). Однако для постановки правильного диагноза и классификации решающее значение имеет анализ функциональной активности ФВ. Исследование ФВ как фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний оценивают по количеству антигена ФВ (ФВ:Аг) в плазме и активности ФВ в плазме. Уровень антигена ФВ в плазме обычно анализируют с помощью иммуноферментного анализа. Также в клиническую практику был внедрен автоматизированный метод на основе турбидиметрической оценки латексных шариков, покрытые антителами к ФВ [14]. Традиционно «золотым стандартом» оценки тромбоцит-зависимой функции ФВ является анализ ристоцетин-кофакторной активности (ФВ:RCo), который был разработан после открытия агрегации тромбоцитов под действием ристоцетина [12]. Неточность и низкая чувствительность теста ФВ:RCo привели к разработке новых методов оценки функциональной активности ФВ. Поэтому в 2014 году подкомитетом по ФВ Комитета по стандартизации и науке (SSC) Международного общества тромбоза и гемостаза (ISTH) была разработана новая номенклатура методов оценки функции ФВ [12].

1. *Анализ ристоцетин-кофакторной активности ФВ (ФВ:RCo).* ФВ:RCo основан на анализе спонтанной агрегации тромбоцитов при активации ФВ антибиотиком ристоцетином. На сегодняшний день ФВ:RCo является полностью автоматизированным тестом. На протяжении десятилетий анализ ФВ:RCo был «золотым стандартом» для измерения активности ФВ, что позволило накопить большой опыт его использования. Более того, большинство данных, касающихся корреляции уровней ФВ в плазме и лечения БВ десмопрессинном или концентратами ФВ, были получены с помощью ФВ:RCo [12]. Однако у анализа ФВ:RCo много недостатков, что приводит к сложной стандартизации получаемых

результатов. Тест имеют низкую чувствительность, что не позволяет оценить активность ФВ при его концентрации  $<10$  МЕ/дл. Кроме того, поскольку соотношение ФВ:RCo/ФВ:Аг имеет важное значение для диагностики БВ, такая низкая чувствительность может привести к потенциальным ошибкам. Высокий коэффициент вариации результатов может привести к ложноположительному диагнозу при умеренном снижении концентрации ФВ. Потенциальным источником ошибок также является вариабельность от партии к партии ристоцетина или тромбоцитарного реагента. Еще один важный недостаток заложен в том факте, что ФВ:RCo фактически измеряет два параметра: (1) связывание ристоцетина с ФВ и (2) связывание «активированного ристоцетином» ФВ с тестируемыми тромбоцитами, то есть активация ФВ происходит не физиологическим агентом – ристоцетином. Так же стоит отметить, что ФВ:RCo имеет известную чувствительность к определенному полиморфизму в гене ФВ (D1472H), который делает ФВ нереактивным по отношению к ристоцетину, но не изменяет его активность *in vivo* [96]. Этот полиморфизм распространен в афроамериканской популяции и приводит к снижению соотношения ФВ:RCo/ФВ:Аг, что, соответственно, приводит к ошибочной диагностике БВ.

2. *Анализ связывания ФВ GP Ib, иницируемое ристоцетином (ФВ:GPIbR)*. В 2000 году Vanhoorelbeke К. с соавт разработали тест на основе иммуноферментного анализа (ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), в котором с помощью МАт на дно планшета были сорбированы только рецепторы тромбоцитов – рекомбинантный GP Ib рецептор (ФВ:GPIbR) [96]. Впоследствии этот же принцип был использован для разработки автоматических тестов с латексными или магнитными частицами. Было показано, что эта методика имеет высокую корреляцию результатов по сравнению с традиционными анализами ФВ:RCo и нивелирует возможные проблемы, связанные с вариабельностью тромбоцитов от партии к партии при измерении активности ФВ. Однако важно отметить, что в анализе ФВ:GPIbR используются разные антитела для сорбирования фрагмента GP Ib, а также различные рекомбинантные фрагменты GP Ib. Источник и концентрация ристоцетина также различны. Наконец, критически

важна эпитопная специфичность МАТ, связывающихся с GP Ib. Тем не менее, правильное автоматическое применение анализа ФВ:GPIbR позволяет точно и с высокой чувствительностью определять активность ФВ [12].

3. *Анализ связывания мутантного GP Ib с усилением функции (ФВ:GPIbM).* Использование в оценке активности ФВ рекомбинантных мутантных фрагментов GP Ib тромбоцитов позволяет спонтанно связываться ФВ и мутантному GP Ib без ристоцетина. Опубликованные данные подтверждают концепцию, что результаты, полученные с помощью оценки ФВ:GPIbM коррелируют с результатами оценки ФВ:RCo [97]. ФВ:GPIbM является более точным и чувствительным. Кроме того, применение оценки ФВ:GPIbM с помощью ELISA позволит различать БВ типа 2А и 2В [12].

4. *Анализ функционального состояния ФВ на основе связывания моноклональных антител (ФВ:Ab).* В анализе ФВ:Ab используется нанотело лампы, которое распознает активную конформацию ФВ (домен А1), что позволяет обнаруживать конституционально активный ФВ при БВ типа 2В и тромботической тромбоцитопенической пурпуре (ТТП), но отсутствует возможность оценить активность ФВ. Было показано, что результаты, полученные с использованием этого теста, хорошо коррелирует с результатами, полученными с помощью ФВ:RCo [14].

Учитывая влияние размера мультимеров ФВ на его функцию, мультимерный анализ имеет важное значение для диагностики не только определенных типов БВ и ТТП, но и приобретенного синдрома Виллебранда, который входит в синдром Heyde. Основным тестом определения качественного дефицита ФВ является мультимерный анализ ФВ, который выполняется с помощью методов электрофореза молекул ФВ в агарозных гелях. Анализ имеет хорошую чувствительность к дефициту высокомолекулярных мультимеров ФВ (ВМФВ). Разработка люминесцентных методов дала возможность детектировать молекулы ФВ в образцах с концентрацией менее 1 МЕ/дл, что позволило различить гомозиготный тип 2 БВ и БВ типа 3. Мультимерный анализ ФВ критически важен для классификации подтипов БВ типа 2. Он также имеет важное значение для



диагностики дефицита ВМФВ при приобретенном синдроме Виллебранда [98]. Однако этот анализ трудно стандартизировать и для его выполнения этого необходимо наличие высококвалифицированного персонала. Поэтому внедрение его в рутинную диагностику сердечно-сосудистых заболеваний является сложной задачей.

Способность ФВ специфически связываться с коллагеном – еще одна важная функция, которую можно оценить в лабораторных условиях. Анализ коллаген-связывающей функции ФВ проводят с помощью ELISA, в котором оценивают способность ФВ связываться с коллагенами различных типов [14]. Было показано, что коллаген-связывающая функция у ВМФВ эффективнее, чем у мультимеров меньшего размера. Поэтому этот метод возможно использовать как альтернативный для оценки мультимерного состава молекул ФВ [14].

Таким образом, для диагностики БВ и ее типов необходим широкий набор тестов. Чтобы упростить тестирование (например, при скрининге нарушений свертываемости крови или в условиях неотложной помощи) необходимо иметь тест, который может быстро исключить БВ или какой-либо дефект тромбоцитов. В качестве такого теста была предложена анализ PFA-100®, в котором анализируются образцы цельной крови, и для выполнения анализа необходимо всего 5 минут [99]. В тесте PFA-100® образец цельной крови движется через узкое отверстие в мембране, покрытое коллагеном и активаторами тромбоцитов, такими как АДФ или адреналин. Система измеряет время от начала движения образца крови через мембрану до полного закрытия отверстия (время закрытия). Скорости сдвига в отверстии достигают  $5000-6000 \text{ c}^{-1}$ , что является порогом активации ФВ. Однако PFA-100® имеет недостаток, связанный с активацией ФВ. Система предназначена для оценки первичного гемостаза, а не исключительно гемостатической функции ФВ. Время закрытия отверстия в мембране зависит от взаимодействия между тромбоцитами и другими клетками крови, а не только от активации ФВ. Чувствительность PFA-100® варьирует в зависимости от тяжести дефицита ФВ и дефектов тромбоцитов, от умеренной в легких случаях и до 100% чувствительности в случае полного отсутствия ФВ в плазме крови [99].

Таким образом, в настоящее время нет широкодоступного теста, который бы измерял гемостатическую функцию ФВ в зависимости от скорости сдвига. Некоторые исследовательские лаборатории создают экспериментальные методы и устройства, например, микрофлюидные системы, для изучения различных аспектов гемостаза, включая функции ФВ. Однако эти устройства громоздки, не стандартизированы и для работы на них необходима высокая квалификация персонала. Таким образом, в настоящее время эти устройства не подходят для применения в клинической практике [100].

#### **1.4. Микрофлюидные технологии для оценки гемостаза**

Микрофлюидная технология включает в себя проектирование и изготовление микропоточковых устройств для использования жидкостей в микрометрических объемах. Хотя микрофлюидные устройства могут быть изготовлены из металла, стекла или пластмасс, в настоящее время в большинстве случаев устройства, используемые в биологических исследованиях клеток, изготовлены из полимера, полидиметилсилоксана (ПДМС). Этот силиконовый каучук является простым в использовании, недорогим, биосовместимым и прозрачным, что делает камеры из ПДМС экономичными и одноразовыми устройствами для исследования тромбообразования.

Важно отметить, что изучению процесса тромбообразования в условиях потока с применением микрофлюидных технологий предшествовали работы с использованием кольцевой перфузионной камер («камера Баумгартнера») [19, 101]. С ее помощью идентифицирован вклад ФВ и FVIII фактора свертывания крови во взаимодействие тромбоцитов с субэндотелиальным слоем сосудов в условиях потока [102, 103]. Исследования тромбообразования в кольцевых перфузионных камерах позволили впервые в 1979 году рассчитать скорость сдвига в потоке жидкости, а так же оценить влияние сдвиговых скоростей на формирование тромба у кроликов [104].

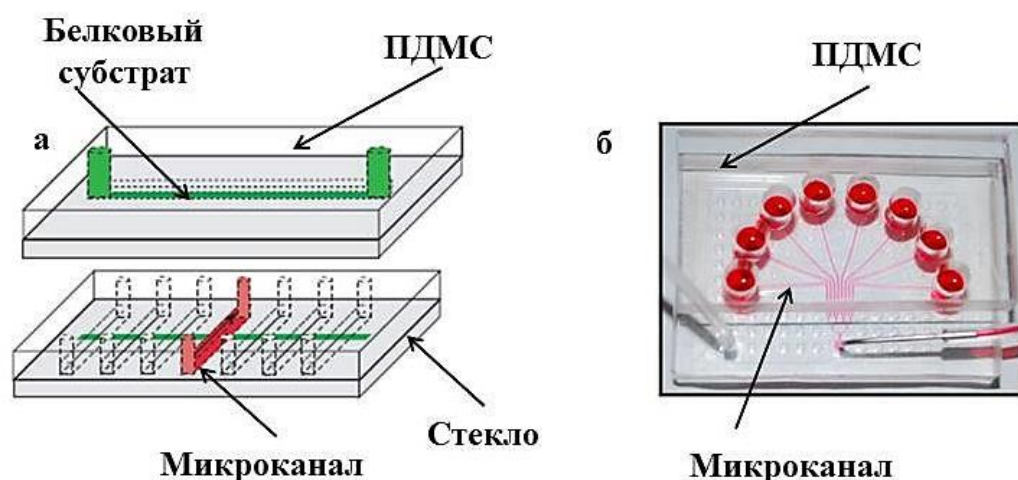
Технологию создания проточных камер из ПДМС (приложение №1) с помощью фотолитографии предложил в 1998 году D. C. Duffy с соавт. [105]. Несмотря на то, что технологии создания проточных камер из ПДМС были

разработаны еще в 90-х годах XX века, для исследования адгезионной функции тромбоцитов они начали применяться примерно через 15 лет, в 2008 году, в составе микрофлюидных устройств. Стоит отметить, что сам термин «микрофлюидика» вошел в широкое использование вместе с появлением первых работ по изучению адгезии клеток в проточных камерах на основе ПДМС в 2004 году [106].

К. В. Neeves с соавт. в 2008 году предложил 13-ти канальное микрофлюидное устройство на основе ПДМС технологии для анализа адгезии тромбоцитов к полосе коллагена I-го типа, адсорбированного на стеклянную подложку перпендикулярно потоку, в малых объемах крови у мышей [107]. Мыши с генетическими дефектами являются хорошими моделями для исследования молекулярных механизмов различных патологий, в том числе сердечно-сосудистых заболеваний и патологий гемостаза. К. В. Neeves продемонстрировал, что микрофлюидная технология на основе ПДМС способна измерять адгезию тромбоцитов к коллагену I-го типа в образце цельной крови мышей в объеме всего 100 мкл при скоростях сдвига, соответствующих артериям и венам. Так же было показано, что созданное устройство позволяет исследовать изменения адгезии тромбоцитов, как мышей дикого типа, так и мышей с дефектом коллагеновых рецепторов.

Наиболее перспективным аспектом микрофлюидной технологии для исследования тромбообразования на основе ПДМС является возможность разрабатывать любые конфигурации микрофлюидных каналов проточной камеры. Это делает данную технологию идеально подходящей для создания многоканальных микрофлюидных систем с целью увеличения пропускной способности методики. Наличие нескольких каналов в одном устройстве допускает проведение нескольких различных исследований за один цикл перфузии, при этом сохраняя минимальный требуемый объем крови (рис. 6). В обзоре E. Westein с соавт. представлено множество многоканальных микрофлюидных систем разноплановой конфигурации, позволяющих исследовать различные функции тромбоцитов [108]. Используя эту возможность, S. F. Maloney с соавт. исследовали влияние антагонистов  $P_2Y_1$  и  $P_2Y_{12}$  на адгезию тромбоцитов мышей к коллагену в устройстве с восемью параллельными каналами [109]. Таким образом, за одну

перфузию менее 100 мкл крови определяли концентрацию полумаксимального ингибирования обоих типов антагонистов. В дальнейшем, это 8-ми канальное устройство было использовано для оценки влияния антагонистов  $P_2Y_1$  и  $P_2Y_{12}$  на адгезию тромбоцитов к коллагену I-го типа у здоровых доноров [110]. Кроме того, микрофлюидные системы оказались полезными при оценке эффективности новых антиагрегантных препаратов, так же позволяя сравнивать их действие с уже существующими агентами [111].



**Рисунок 6.** Многоканальные микрофлюидные системы для исследования адгезии тромбоцитов, созданные с использованием ПДМС технологий. а – схематическая иллюстрация семиканальной проточной камеры с полосой адгезивного белка, иммобилизованного на стеклянную подложку; б – фотография восьмиканальной проточной камеры. Рисунок был заимствован у T.V. Colase с соавт. [112] и модифицирован.

Разработка микрофлюидных технологий привела к всплеску их использования в фундаментальных и прикладных исследованиях гемостаза. Эти устройства позволяют проводить оценку эффективности действия лекарственных веществ в экспериментах *in vitro*, когда пациент принимает препарат, или *ex vivo*, добавляя вещество в образцы пациента непосредственно перед исследованием [17].

Микрофлюидные технологии использовались в опытах по исследованию взаимодействия тромбоцитов с ФВ [113]. Использование микрофлюидных технологий также внесло значительный вклад в изучение биологии ФВ. В работе Zheng Y. с соавт. было показано, что при стимулировании высвобождения

сверхбольшого ФВ (УВМФВ) из эндотелиальных клеток молекулы ФВ образуют струны [114]. Это позволило им предположить, что скорость потока резко влияет на конформацию ФВ. Эксперименты с помощью микрофлюидных технологий сыграли важную роль при исследовании функции ADAMTS-13, который расщепляет ФВ и модулирует его протромботическую активность [115].

Способы детектирования адгезированных тромбоцитов в микрофлюидных устройствах, как правило, аналогичны методам, используемым в плоскопараллельных камерах [116]. Наиболее распространенными применяемыми методиками являются: фазово-контрастная, флуоресцентная и сканирующая электронная микроскопия. Разнообразие методов количественной оценки тромбообразования в проточной камере с использованием конфокальной микроскопии препятствует их сравнению между собой. K. Claesson, T. L. Lindahl и L. Faxälv предложили метить только 5% тромбоцитов из образца цельной крови для стандартизации количественного измерения адгезии тромбоцитов ко дну проточной камеры, определяя положение отдельных тромбоцитов в растущем тромбе с использованием конфокальной микроскопии [117]. Существует попытка объединения нескольких методов микроскопии для повышения чувствительности анализа адгезировавших тромбоцитов, а именно, одновременное использование флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения, высокоскоростной эпифлуоресцентной и дифференциально-интерференционной контрастной микроскопии [118]. Тем не менее, остается необходимость разработки надежной автоматизированной процедуры анализа изображений для количественной оценки адгезии тромбоцитов в реальном времени.

Существует ряд работ, в которых были продемонстрированы попытки создания альтернативных методов количественного измерения адгезии тромбоцитов еще до начала активного применения микрофлюидных технологий для оценки тромбообразования. Так, L. G. Puckett с соавт. предложили метод мониторинга тромбообразования, основанный на применении магнитоупругого датчика [119]. Они продемонстрировали, что при адгезии тромбоцитов в образце цельной крови, при инкубации на одноразовом магнитоупругом сенсоре,

происходит изменение его резонансной частоты колебаний при приложении определённого внешнего магнитного поля, значение которого было подобрано в контрольных исследованиях. Однако эта технология обладает существенным недостатком, а именно отсутствием условий потока. Другой метод определения адгезии тромбоцитов использует кварцевый кристалл с золотыми электродами [120]. Метод основан на измерении резонансной частоты кристалла в переменном электрическом поле, который модулируется изменением массы адгезировавших тромбоцитов на поверхности сенсора. Этот способ детекции может регистрировать эффекты стимуляции АДФ и ингибирования взаимодействия тромбоцитов с поверхностью коллагена I-го типа с помощью блокирования интегрин  $\alpha_2\beta_1$  и GP VI. Однако, эти методики также не позволяют производить измерения адгезии тромбоцитов в условиях потока, что ограничивает их применение в исследовательской практике. Hansson с соавт. предложили технологию анализа адгезии тромбоцитов на фибриногеновую или коллагеновую подложку в реальном времени с использованием проточной камеры и детектора на основе поверхностного плазмонного резонанса [121]. Метод детекции взаимодействия тромбоцитов и белковой поверхности основан на измерении угла, при котором камерой регистрируется минимальная, в результате резонансных явлений, интенсивность отраженного луча. Изменение резонансного угла происходит при изменении показателя преломления на границе раздела фаз золотой поверхности, покрытой фибриногеном или коллагеном, и плазмы крови. Несмотря на то, что эффект поверхностного плазмонного резонанса позволяет зондировать образцы крови при движении через проточную камеру глубиной всего 100 нм, что является преимуществом методики для детекции только адгезировавших тромбоцитов, его использование считается достаточно дорогим и трудоемким.

С началом активного использования ПДМС технологий в микрофлюидных исследованиях гемостаза возобновились попытки применения альтернативных от микроскопии методов количественного измерения адгезии тромбоцитов. В 2013 году К. F. Lei с соавт. предложили реализовывать количественную оценку тромбообразования с помощью импедансометрии образцов крови [122]. Они

регистрировали изменение общего сопротивления крови при ее инкубации со стеклянной поверхностью, в камере из ПДМС с лунками для внесения исследуемых образцов. Техника импедансометрии была применена L. Polgár с соавт. для количественного измерения адгезии и распластывания тромбоцитов на поверхность при добавлении АДФ, адреналина или коллагена [123]. В своей работе они использовали коммерческую тест-систему xCELLigence® RTCA SP, в основе которой лежит технология импедансометрии, созданную для анализа в реальном времени клеточной пролиферации и их адгезии [124]. Однако в этих экспериментах не было создано условий потока, что является важным для исследования адгезионной функции тромбоцитов, как в норме, так и при различных патологиях.

Для создания микрофлюидных устройств, пригодных для клинической диагностики остается ряд проблем. Хотя затраты на изготовление самого устройства (проточная камера) низки, инструменты (микроскоп), необходимые для сбора и анализа данных, являются сложными и дорогостоящими. Микрофлюидная методология относительно новая, поэтому пока ее стандартизация является нерешенной задачей. Измерение интересующих параметров зависит от подложки, условий потока и геометрии канала [15]. Для устройств, которые могут применяться в клинических лабораториях, изготовление одноразовых микрофлюидных устройств, вероятно, позволит улучшить перспективу их использования в клинической и лабораторной практике.

На сегодняшний день опубликовано множество обзоров по теме создания и применения микрофлюидных технологий в фундаментальных и прикладных исследованиях, ограничениях применения устройств и об их перспективах использования в клинических лабораториях [19, 112, 125-127]. Тем не менее, проблема быстрого и доступного детектирования адгезии клеток крови, в том числе тромбоцитов, до сих пор не решена.

Таким образом, несмотря на достаточное количество современных работ, описывающих методики измерения адгезии клеток крови, в частности тромбоцитов, не происходит внедрения этих тестов в клиническую практику из-за своей трудоемкости, дороговизны оборудования и программного обеспечения, а

также их длительного выполнения. Разработка простого и информативного метода оценки адгезии клеток крови к белковой поверхности является нерешенной задачей. Основные критерии, необходимые для разработки системы для оценки адгезии клеток крови к белковой подложке:

- Возможность регистрации результатов в реальном времени
- Создание контролируемого потока
- Простота выполнения
- Низкая стоимость
- Высокая информативность



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

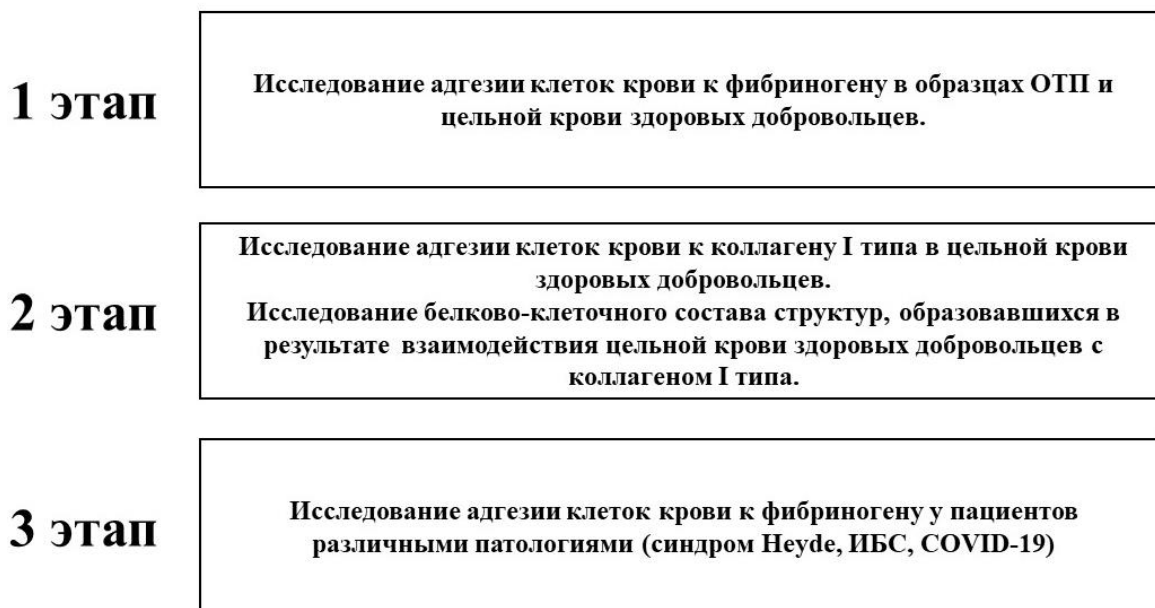
### 2.1 Материалы

В работе использовали фибриноген (KabiVitrum, Швеция), АДФ (Sigma, США), фосфатно-солевой буфер (Sigma, США), 0,9% NaCl (Реахим, Россия), D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone, РРАСК, Enzo, США), моноклональные антитела (мАТ) АК2 к GP Ib [128] и Fab<sub>2</sub> фрагменты мАТ к CRC64 GP IIb/IIIa («Монафрам», Россия, любезно предоставленные Мазуровым А.В.). Раствор коллаген крысы типа I (Sigma, США), параформальдегид (Sigma, США), Triton X-100 (Sigma, США), акридиновый оранжевый (АО, Sigma, США). 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, Thermo Fisher Scientific, США), мАТ мыши против фактора фон Виллебранда человека (любезно предоставленные Мазуровым А.В. [129]), козы мАТ против мышинных мАТ, меченые флуоресцеином изотионатом (ФИТЦ) (Invitrogen, США). Растворы коллагена и DAPI хранили аликвотами при +4 °С, растворы фибриногена и АДФ хранили в аликвотах при температуре – 20°С, мАТ – при –70 °С. Фибриноген разводили в дистиллированной воде согласно инструкции производителя. Для покрытия оптической подложки слоем фибриногена её поверхность инкубировали с раствором фибриногена в концентрации 50 мкг/мл в течение 10 минут. Для покрытия оптической подложки слоем коллагена её поверхность инкубировали с раствором коллагена в концентрации 0,1 мг/мл в течение 2 часов при комнатной температуре. Стеклянную поверхность оптической подложки перед покрытием фибриногеном и коллагеном очищали 70-ти % раствором этилового спирта.

### 2.2 Дизайн исследования и характеристика здоровых добровольцев и больных, включенных в исследование

Проведенное в диссертационной работе исследование, состояло из трех этапов (рис. 7). На первом этапе была проведена апробация созданной микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к фибриногену в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) и цельной крови здоровых добровольцев.

Второй этап исследования состоял в апробация созданной микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к коллагену I типа в образцах цельной крови здоровых добровольцев и исследование с помощью методов микроскопии структур, образовавшихся в результате взаимодействия цельной крови с коллагеном I типа.



**Рисунок 7.** Дизайн исследования. ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИБС – ишемическая болезнь сердца, COVID-19 – новая коронавирусная инфекция.

На третьем этапе была проведена оценка кинетики адгезии клеток крови к белковым поверхностям в образцах ОТП и цельной крови больных с синдромом Heyde, тяжелым стенозом клапана аорты, ранней ИБС и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

В исследование были включены 28 здоровых добровольцев, 7 больных с тяжелым стенозом клапана аорты (АС), 6 пациентов с синдромом Heyde, 22 больных с ранней ишемической болезнью сердца и 17 больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Все исследования были проведены с использованием информированного согласия пациентов и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы

проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и одобрены Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ России.

В первых двух этапах работы была использована ОТП и цельная кровь 28 здоровых добровольцев (18 мужчин, 10 женщин) в возрасте  $37 \pm 14$  лет. Здоровыми считали тех добровольцев, у которых отсутствовали клинические проявления заболеваний крови и сердечно-сосудистых заболеваний, так же они не принимали никаких препаратов, влияющих на систему гемостаза. Все здоровые добровольцы за 48 часов до исследований не принимали нестероидных противовоспалительных препаратов и алкоголь.

На следующем этапе была исследована цельная кровь 6 больных (2 мужчины, 4 женщины) в возрасте  $76 \pm 9$  лет со стенозом аортального клапана со средним трансклапанным градиентом давления ( $\Delta P_m$ )  $\geq 40$  мм.рт.ст., пиковой скоростью тока через аортальный клапан ( $V_{max}$ )  $\geq 4$  м/с и с желудочно-кишечным кровотечением или с состоявшимся желудочно-кишечным кровотечением в анамнезе (синдром Heyde по клиническим признакам) и 7 больных (2 мужчины, 5 – женщины) без желудочно-кишечного кровотечения в возрасте  $72 \pm 4$  года. Всем больным предстояла операция по протезированию аортального клапана в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ.

В работе была использована ОТП и цельная кровь 22 пациентов с ИБС мужского пола в возрасте  $52 \pm 7$  лет, наблюдавшиеся в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ, у которых возраст возникновения первого события ИБС был  $46 \pm 8$  лет.

На заключительном этапе была исследована цельная кровь 17 пациентов (5 мужчин, 12 женщин) с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в возрасте  $64 \pm 11$  лет. Больные с COVID-19 были госпитализированы в отделение реанимации и интенсивной терапии «красной зоны» ГКБ № 23 им И.В. Давыдовского с июня по август 2021 года и не были вакцинированы ни одной из зарегистрированных вакцин против COVID-19.

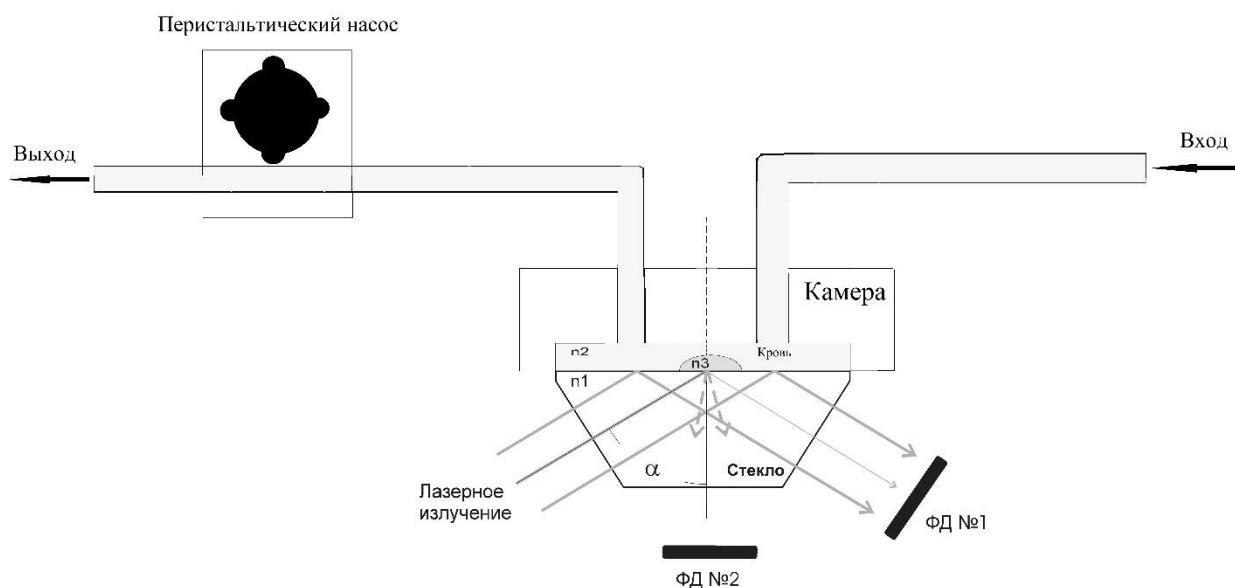
В исследования не включались пациенты в первые 2 месяца после перенесённого инфаркта миокарда, с острым нарушением мозгового кровообращения, с хроническими аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, со злокачественными новообразованиями, с наследственными тромбоцитопатиями, гемофилией, тромбоцитопениями, дефицитами других факторов свертывания крови.

### **2.3 Приготовление образцов цельной крови и обогащенной тромбоцитами плазмы, определение плазменного уровня фактора фон Виллебранда в плазме крови**

Для исследования адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности использовали цельную кровь здоровых добровольцев и пациентов, которую отбирали из локтевой вены с помощью системы S-Monovette (Германия), содержащей 3,2% цитрата натрия в соотношении антикоагулянт/кровь 1/9. Для оценки адгезии клеток крови к коллагену типа I была использована цельная кровь здоровых добровольцев, которую отбирали из локтевой вены с помощью системы S-Monovette (Германия), содержащей 100 мкМ РРАСК в соотношении антикоагулянт/кровь 1/10 [130]. ОТП получали центрифугированием цельной крови при 200g в течение 5-ти минут, 2/3 части супернатанта отбирали для дальнейших исследований. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали повторным центрифугированием оставшейся части ОТП при 2000g в течение 15-ти минут. Анализ адгезии клеток крови проводили через 0,5 часа после забора крови. Количество антигена фактора фон Виллебранда (ФВ:Аг) определяли в БТП методом иммуноферментного анализа [129]. Единицы измерения концентрации ФВ в плазме - % от нормального содержания. Подсчет количества клеток крови в ОТП и цельной крови производили на гематологическом анализаторе Abacus Junior B (Diatron Ltd., Австрия).

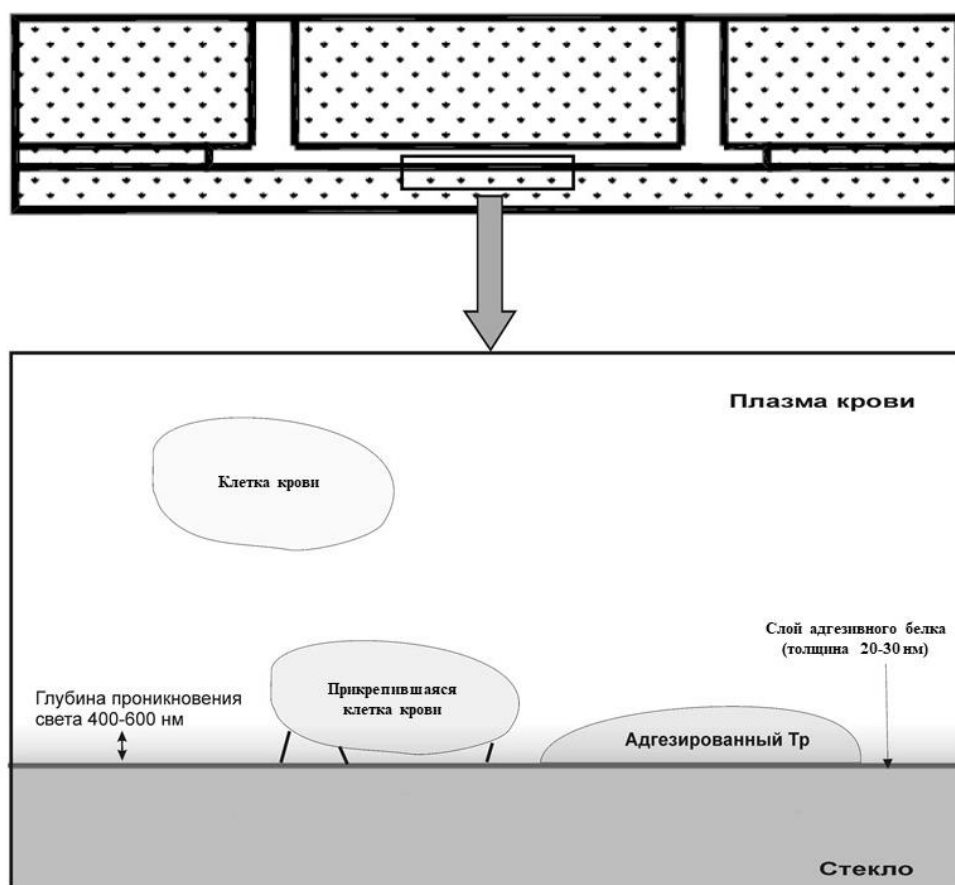
## **2.4 Микрофлюидная система для регистрации кинетики адгезии клеток крови к адгезивному белковому покрытию в условиях потока**

Для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковым поверхностям в условиях контролируемого потока была разработана микрофлюидная система, имитирующая кровотоки в кровеносных сосудах, состоящая из оптической подложки, двух фотодетекторов (ФД), управляемого компьютером перистальтического насоса P625 (Instech Laboratories, Inc., США), аналого-цифрового преобразователя (АЦП) «Е-14-140М» (L-Card, Россия) и полупроводникового лазера с длиной волны излучения  $\lambda = 650$  нм. Схема микрофлюидной системы и принцип регистрации адгезированных к белковой поверхности клеток крови представлена на рисунке 8. Принцип регистрации адгезированных к белковой поверхности клеток крови заключался в том, что лазерное излучение, падающее на границу оптических сред стекло–плазма крови при углах падения более критического, полностью отражалось от поверхности подложки по закону полного внутреннего отражения и регистрировалось фотоприемником ФД<sub>1</sub>. Тем не менее, отраженный свет проникал в образец цельной крови или ОТП за зону отражения на глубину примерно 400-600 нм и при адгезии клеток крови на оптическую подложку взаимодействовал с клетками крови, вызывая изменения в интенсивности отраженного и рассеянного излучения, которые регистрировались двумя фотоприемниками (ФД<sub>1</sub> - интенсивность отраженного света, ФД<sub>2</sub> - интенсивность рассеянного света).



**Рисунок 8.** Схема микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковой поверхности. Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) или цельная кровь попадала в проточную камеру с помощью управляемого компьютером перистальтического насоса. ФД<sub>1</sub> регистрирует отраженное от границы оптических сред стекло-плазма лазерное излучение. ФД<sub>2</sub> – регистрирует рассеянное клетками крови лазерное излучение, проникающее за границу раздела оптических сред на  $\approx 400$  нм. ФД<sub>1</sub> – фотодетектор №1, ФД<sub>2</sub> – фотодетектор №2.

Взаимодействие клеток крови с оптической подложкой в тонком пристеночном слое (толщиной до 400 нм) осуществлялось в проточной камере, которая состояла из стеклянной оптической подложки, покрытой фибриногеном или коллагеном, корпуса из оргстекла, создающей канал для потока крови или ОТП (рис. 9). Регистрируемые изменения сигналов на ФД<sub>1</sub> и ФД<sub>2</sub> происходили только в том случае, когда клетки крови плотно «прилипали» к белковой подложке. Тромбоциты и другие клетки крови в потоке не взаимодействовали с лазерным излучением, которое проникает на глубину всего 400 - 600 нм, и не влияли на изменения сигналов на ФД<sub>1</sub> и ФД<sub>2</sub>.



**Рисунок 9.** Схематическая иллюстрация проточной камеры со стеклянной оптической подложкой, покрытой адгезивным белком. Адгезированные клетки крови на поверхности проточной камеры взаимодействуют с лазерным излучением, проникающим в образец цельной крови или ОТП на глубину до 400-600 нм. Интенсивность отраженного и/или рассеянного адгезировавшими клетками лазерного излучения регистрируется фотоприемниками. Тр – тромбоцит.

В процессе исследования адгезии тромбоцитов циркуляция ОТП вдоль лазерной оптической системы происходила со скоростью сдвига  $1700 \text{ с}^{-1}$ . Расчет сдвиговых скоростей при использовании образцов ОТП был произведен по формуле:

$$\gamma = \frac{6 \cdot Q}{L \cdot H^2};$$

где  $Q$  – расход ОТП в единицу времени,  $L$  – ширина проточной камеры (0,3 см),  $H$  – высота проточной камеры (0,01 см) [131].

Необходимые значения скоростей сдвига получали с помощью управляемого с компьютера перистальтического насоса, изменяя параметр расхода ( $Q$ ) ОТП в единицу времени. Произвести расчет значений скоростей сдвига в случае использования образцов цельной крови на данный момент невозможно, так как не существует необходимых формул и условий. Поэтому в данной работе расчет значений скоростей сдвига при циркуляции образцов цельной крови через проточную камеру не был произведен. Регистрацию кинетики адгезии клеток крови к иммобилизованному на оптической подложке фибриноговому или коллагеновому покрытию производили с помощью программного обеспечения L-Graph2 (Россия).

Степень адгезии клеток крови оценивали путем измерения увеличения интенсивности рассеянного и снижения интенсивности отраженного лазерного излучения от оптической подложки камеры в течение 15-ти минутной циркуляции образцов цельной крови и ОТП через проточную камеру. Непосредственно перед исследованиями адгезии клеток крови к фибриногену в образцах ОТП и цельной крови тромбоциты активировали 5 мкМ АДФ. Для исследования адгезии клеток крови к коллагену типа I в образцах цельной крови предварительная активация тромбоцитов не требовалась. Вклад взаимодействия GP Ib рецепторов тромбоцитов и ФВ в адгезию клеток крови исследовали блокированием с помощью добавления МАт к GP Ib (10 мкг/мл) в образцы ОТП и цельной крови здоровых добровольцев и пациентов. Вклад взаимодействия GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов с фибриногеном в адгезию клеток крови – с помощью блокирования Fab<sub>2</sub> фрагментов МАт к GP IIb/IIIa (20 мкг/мл).

Для оценки вклада GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов в адгезию клеток крови производили расчет степени ингибирования адгезии при блокировании этих рецепторов. На первом этапе апробации микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к фибриногену и коллагену типа I в образцах ОТП и цельной крови здоровых добровольцев степень



ингибирования адгезии рассчитывалась как отношение интенсивности оптического сигнала, регистрируемых на  $\Phi D_2$  и  $\Phi D_1$  при инкубации цельной крови или ОТП с мАт к интенсивности оптического сигнала в контрольных исследованиях на 15-ой минуте после начала потока. На этапах оценки адгезии клеток крови к фибриногену у пациентов с помощью созданной микрофлюидной системы степень ингибирования адгезии рассчитывалась как отношение интенсивности оптического сигнала, регистрируемого только на  $\Phi D_2$  при инкубации цельной крови или ОТП с мАт к интенсивности оптического сигнала в контрольных исследованиях на 15-ой минуте после начала потока.

## **2.5 Окрашивание образцов в проточной камере, образовавшихся в результате взаимодействия цельной крови с белковой поверхностью по методу Гимза и флуоресцентными красителями**

Образцы в проточной камере, образовавшиеся в результате взаимодействия цельной крови здоровых добровольцев с коллагеновой поверхностью в течении 15 минут, фиксировали 3,7% раствором формалина (5 минут).

После фиксации образцов в проточной камере проводили их окрашивание по методу Гимза согласно инструкции производителя. Тромбоциты в цельной крови окрашивали акридиновым оранжевым (АО) с конечной концентрацией 25 мкМ в течение 20 минут непосредственно перед началом эксперимента. ФВ окрашивали путем инкубации образцов в проточной камере с мышинными мАт против ФВ (10 мкг/мл) в течение 40 мин, промывали раствором ФСБ. Далее эти образцы инкубировали с ФИТЦ-мечеными козьими анти-мышинными мАт (10 мкг/мл) в течение 40 мин в темноте и снова промывали раствором ФСБ. Для окрашивания лейкоцитов исходный раствор DAPI в диметилформамиде (5 мг/мл) разводили 1:5000 в ФСБ. Образцы в проточной камере инкубировали с 0,5% раствором Triton X-100 в течение 2 мин, промывали раствором ФСБ. Далее эти образцы инкубировали с DAPI (1 мкг/мл) в течение 5 мин, после этого снова промывали проточную камеру раствором ФСБ.

Все образцы анализировали под флуоресцентным микроскопом Leica DM 5000 В с цифровой камерой (DFC 420 С), управляемым программным

обеспечением (Leica Applications Suite Version 3.8.0). Образцы, окрашенные по методу Гимза, исследовали в режиме светлого поля. Флуоресцентно окрашенные образцы анализировали с использованием наборов одиночных интерференционных фильтров для синего (DAPI), зеленого (ФИТЦ) и красного (АО) цветов.

## **2.6 Статистическая обработка данных**

Статистические данные для значений с асимметричным распределением были представлены через медиану (верхний квартиль, нижний квартиль). Сравнение результатов исследования проводилось U-критерием Манна-Уитни для сравнения двух групп и критерием Краскела-Уоллиса ANOVA для сравнения трёх и более групп пациентов. Различия считались статистически значимыми, если нулевая гипотеза не подтверждалась с вероятностью  $>95\%$ . Для анализа использовалось программное обеспечение STATISTICA версии 6.0 (StatSoftInc., США).

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. АДГЕЗИЯ КЛЕТОК КРОВИ К БЕЛКОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ В УСЛОВИЯХ ПОТОКА В ОБРАЗЦАХ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ И ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ**

Проверка разработанной микрофлюидной системы (МФС) для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковой поверхности (фибриноген, коллагены) в условиях потока проводилась в несколько этапов.

На первом этапе разработка и апробация методики исследования адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности в потоке с помощью созданной МФС проводилась в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) и цельной крови здоровых добровольцев. На этом этапе проводилась оценка адгезии тромбоцитов к фибриногену в ОТП, полученной из цельной крови, антикоагулированной цитратом натрия (рис. 10 и 11). Далее исследование адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности с помощью созданной МФС проводилось в цельной крови здоровых добровольцев, антикоагулированной цитратом натрия (рис. 12, 13, 14). Тромбоциты в опытных образцах активировали 5 мкМ АДФ непосредственно перед исследованиями.

На втором этапе исследование адгезии клеток крови в цельной крови здоровых добровольцев проводилось к поверхности, покрытой коллагеном I типа (рис. 15 и 16). Для этого этапа разработки методики исследования адгезионной функции клеток крови была использована цельная кровь здоровых добровольцев, антикоагулированная РРАСК (прямой ингибитор тромбина) для сохранения физиологических концентраций кальция в крови. Предварительная активация тромбоцитов в опытах по адгезии клеток крови к коллагеновой поверхности не требовалась.

В процессе апробации МФС и разработки методики исследования адгезии клеток крови к белковой поверхности в условиях потока так же был оценен вклад GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов в адгезию клеток крови. О «прилипании» клеток крови к адгезивной белковой поверхности судили по росту интенсивности сигнала рассеянного лазерного излучения на ФД<sub>2</sub> и по снижению

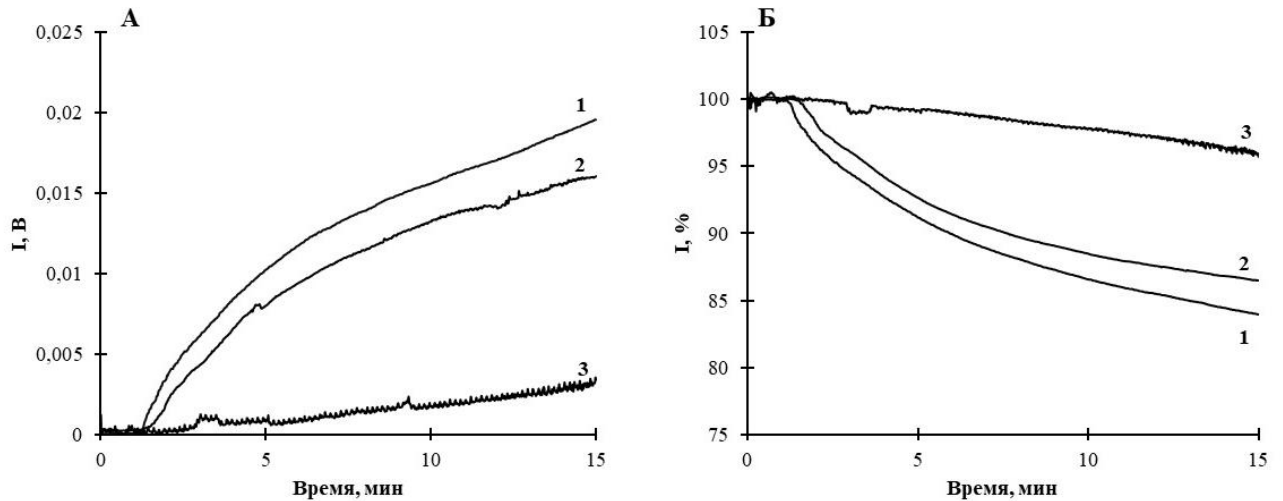
интенсивности сигнала отраженного лазерного излучения на ФД<sub>1</sub>. Вклад GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов оценивали по степени ингибирования адгезии клеток крови к белковой поверхности моноклональными антителами (mAb), блокирующие активность этих рецепторов.

На данной этапе исследования также с помощью методов световой микроскопии (в том числе, флуоресцентной) был исследован клеточный и белковый состав структур, образовавшихся в результате взаимодействия образцов крови с коллагеном, в МФС в условиях контролируемого потока (рис. 17, 18, 19).

### **3.1 Адгезия тромбоцитов к фибриногеновой поверхности в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев**

На рисунке 10 представлены типичные кривые кинетики адгезии тромбоцитов к покрытой фибриногеном поверхности проточной камеры в образцах ОТП здорового добровольца. После получения ОТП из цельной венозной крови, антикоагулированной цитратом натрия, был произведен подсчет тромбоцитов на гематологическом анализаторе. Концентрация тромбоцитов в ОТП составляла  $200 \cdot 10^3$ /мкл. Скорость сдвига при движении ОТП через проточную камеру составляла  $1700 \text{ с}^{-1}$ . Как видно из результатов, представленных на рисунке 10А, наибольшие изменения интенсивности рассеянного света, регистрируемого на ФД<sub>2</sub>, были зарегистрированы в контрольном исследовании адгезии тромбоцитов (кривая 1, рис. 10А). При блокировании GP Ib тромбоцитов (рецептор к фактору фон Виллебранда) mAb происходило незначительное снижение изменения регистрируемого на ФД<sub>2</sub> рассеянного лазерного излучения (кривая 2, рис. 10А). Аналогичные изменения оптического сигнала при движении ОТП через проточную камеру наблюдались при регистрации отраженного лазерного излучения на ФД<sub>1</sub> (рис. 10Б). Наибольшее изменение оптического сигнала было зарегистрировано в контрольном исследовании (кривая 1, рис. 10Б), чуть меньшее изменение – при блокировании GP Ib рецепторов тромбоцитов (кривая 2, рис. 10Б). Блокирование GP IIb/IIIa тромбоцитов (рецептор к фибриногену) путем добавления Fab<sub>2</sub> фрагментов mAb в ОТП приводило к ингибированию адгезии тромбоцитов к

фибриногену и отсутствию изменений интенсивности оптического сигнала на ФД<sub>1</sub> и ФД<sub>2</sub> (рис 10, кривые 3).

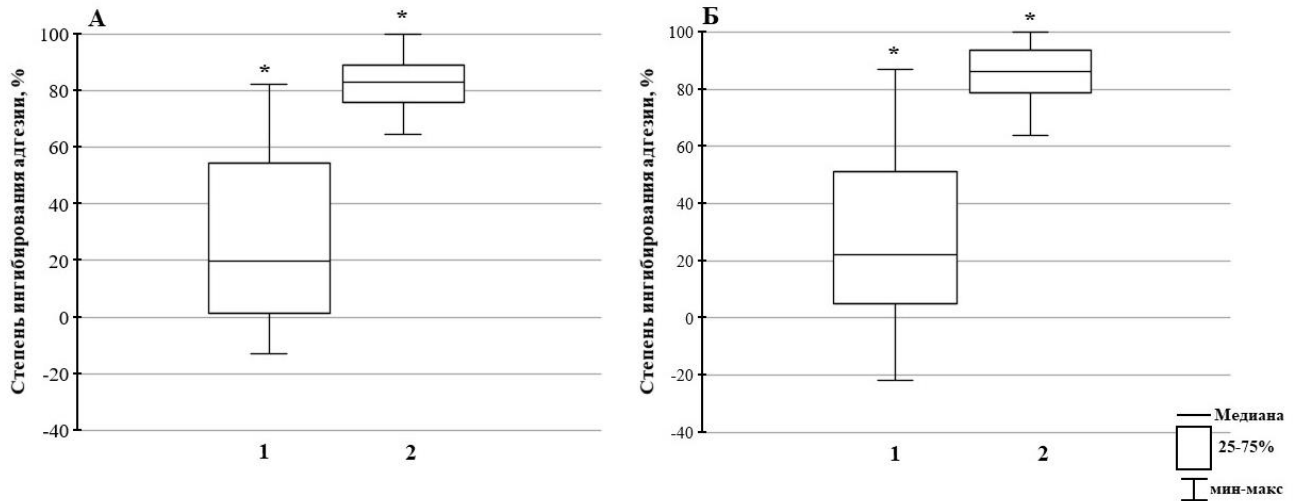


**Рисунок 10.** Изменение интенсивности рассеянного лазерного излучения (А) и отраженного лазерного излучения (Б) при адгезии тромбоцитов к фибриногеновой подложке в условиях потока в образцах ОТП здорового добровольца. Концентрация тромбоцитов в ОТП –  $200 \cdot 10^3$ /мкл. **1** – ОТП; **2** – ОТП + мАт к GP IIb/IIIa; **3** – ОТП + мАт к GP Ib/IIIa. I – интенсивность лазерного излучения рассеянного (В) и отраженного (%).

На рисунке 11 продемонстрированы статистические данные, полученные при исследовании роли GP IIb/IIIa и GP Ib в адгезии тромбоцитов к фибриногену в образцах ОТП ( $n = 10$ ) здоровых добровольцев. Адгезию тромбоцитов в ОТП регистрировали в течение 15-ти минут при скорости сдвига ( $\gamma$ )  $1700 \text{ с}^{-1}$ . Вклад GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов в адгезию тромбоцитов оценивали путем расчета степени ингибирования адгезии при блокировании этих рецепторов. Средняя концентрация ФВ в плазме составляла  $82 \pm 38 \%$  (табл. 1).

При регистрации изменений интенсивности рассеянного лазерного излучения на ФД<sub>2</sub> степень ингибирования тромбоцитарной адгезии после предварительной инкубации образцов ОТП с мАт к GP IIb/IIIa составляла 19,6 % (-1,8; 57,6), после добавления мАт к GP Ib/IIIa составляла 82,8 % (74,7; 89,7) (рис. 11А). При регистрации изменений интенсивности отраженного лазерного излучения на

ФД<sub>1</sub> степень адгезии тромбоцитов после блокирования GP Ib с помощью мАТ составляла 22 % (3,2; 52,8), после блокирования GP IIb/IIIa составляла 86,2 % (77,3; 94,7) (рис. 11Б).



**Рисунок 11.** Степень ингибирования адгезии тромбоцитов к фибриногену в образцах ОТП здоровых добровольцев при регистрации рассеянного (А) и отраженного (Б) лазерного излучения. **1** - после добавления мАТ к GP Ib; **2** - после добавления мАТ к GP IIb/IIIa.

\*-  $p < 0,05$  (Манна-Уитни тест,  $n = 10$ )

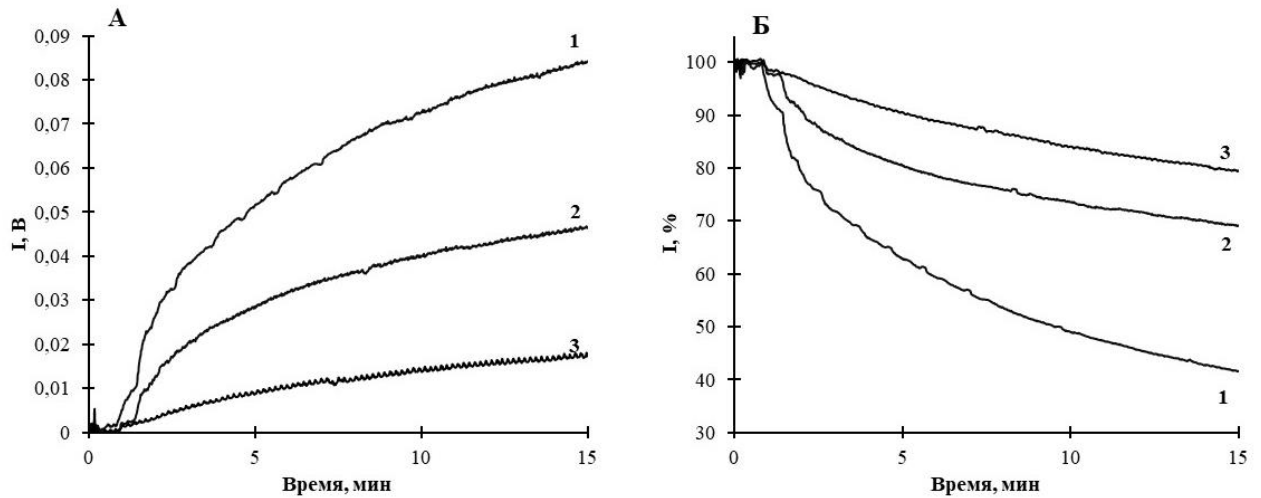
Полученные на начальном этапе результаты свидетельствуют о возможности исследования адгезии тромбоцитов в образцах ОТП здоровых добровольцев к белковой поверхности в условиях потока с помощью созданной МФС [132]. Приготовление ОТП из цельной крови требует некоторых временных затрат, увеличивает вероятность ошибки на этапе пробоподготовки и значительно уменьшает объем исследуемого образца. Так же, известно, что эритроциты, которые отсутствуют в ОТП, способствуют перемещению тромбоцитов в потоке к пристеночному слою, что оказывает влияние на адгезию тромбоцитов к сосудистой стенке [133]. Поэтому последующие этапы проверки эффективной регистрации адгезии клеток крови к белковой поверхности проводились с использованием образцов цельной крови.

### 3.2 Адгезия клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови здоровых добровольцев

Далее исследования эффективности разработанной методики регистрации адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности с помощью МФС проводились в образцах цельной крови здоровых добровольцев. Скорость сдвига при движении ОТП через проточную камеру составляла  $1700 \text{ с}^{-1}$ . Значение скорости сдвига в случае использования цельной крови не было рассчитано. Однако параметр расхода ОТП ( $Q$ ) в единицу времени, используемый для получения скорости сдвига  $1700 \text{ с}^{-1}$ , не изменялся в случае использования образцов цельной крови.

На рисунке 12 представлены типичные кривые кинетики адгезии клеток крови к покрытой фибриногеном поверхности проточной камеры в цельной крови здорового добровольца, антикоагулированной цитратом натрия. Концентрация тромбоцитов в цельной крови составляла  $197 \cdot 10^3/\text{мкл}$ . Из представленных на рисунке 12А данных видно, что наибольшие изменения интенсивности рассеянного света, регистрируемого на ФД<sub>2</sub>, были зарегистрированы в контрольном исследовании адгезии тромбоцитов (кривая 1, рис. 12А). Блокирование GP IIb тромбоцитов с помощью мАт приводило к значительному снижению адгезии тромбоцитов (кривая 2, рис. 12А). Ингибирование взаимодействия тромбоцитов и фибриногена добавлением Fab<sub>2</sub> фрагментов мАт к GP IIb/IIIa приводило к значительному блокированию адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности и слабому изменению интенсивности регистрируемого оптического сигнала на ФД<sub>2</sub> (кривая 3, рис. 12А). Зеркальные изменения оптического сигнала при движении цельной крови через проточную камеру наблюдались при регистрации отраженного лазерного излучения на ФД<sub>1</sub> (рис. 12Б). Наибольшее изменение оптического сигнала было зарегистрировано в контрольном исследовании (кривая 1, рис. 12Б), значительно меньшее изменение – при блокировании GP IIb рецепторов тромбоцитов (кривая 2, рис. 12Б). Блокирование GP IIb/IIIa тромбоцитов так же приводило к выраженному снижению адгезии

тромбоцитов к фибриногену и малому изменений интенсивности оптического сигнала на ФД<sub>1</sub> и ФД<sub>2</sub> (рис. 12, кривые 3).

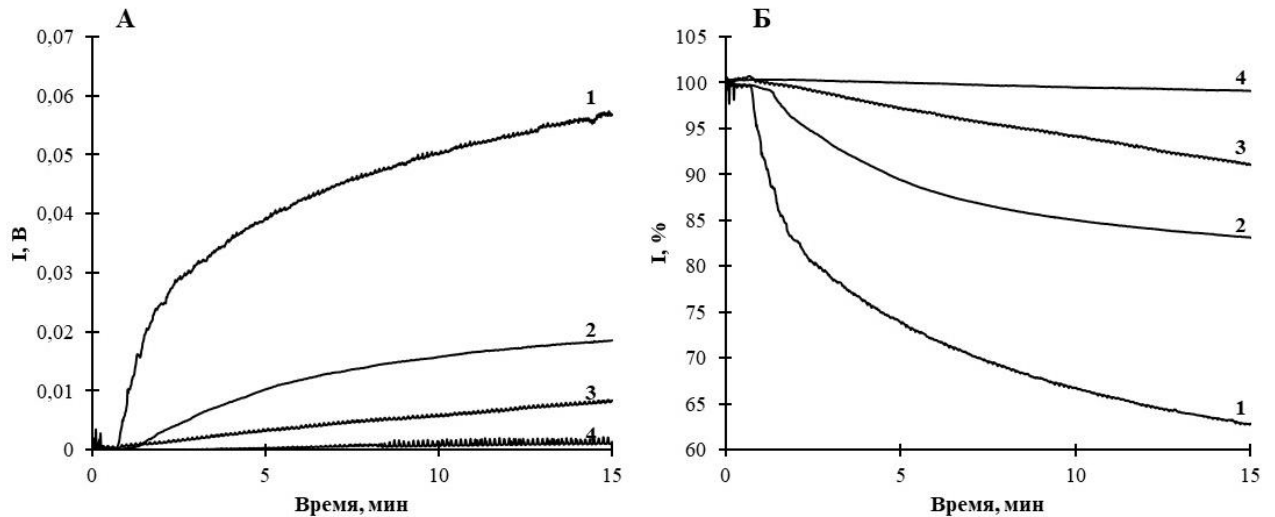


**Рисунок 12.** Изменение интенсивности рассеянного лазерного излучения (А) и отраженного лазерного излучения (Б) при адгезии клеток крови к фибриногеновой подложке в условиях потока в образцах цельной крови здорового добровольца. Концентрация тромбоцитов в цельной крови –  $197 \cdot 10^3/\text{мкл}$ . **1** – цельная кровь; **2** – цельная кровь + мАт к GP Ib; **3** – цельная кровь + мАт к GP Ib/IIIa. I – интенсивность лазерного излучения рассеянного (В) и отраженного (%).

На рисунке 13 продемонстрированы типичные кривые адгезии клеток крови к покрытой фибриногеном поверхности проточной камеры в образцах ОТП и цельной крови одного и того же здорового добровольца. Концентрация тромбоцитов в образцах ОТП и цельной крови составляла  $200 \cdot 10^3/\text{мкл}$  и  $110 \cdot 10^3/\text{мкл}$ , соответственно. Как видно из результатов, представленных на рисунке 13, наибольшие изменения интенсивности рассеянного света, регистрируемого на ФД<sub>2</sub>, были зарегистрированы в случае использования образцов цельной крови, а не ОТП (рис. 13А, кривые 1 и 2, соответственно). Аналогичные изменения оптического сигнала при циркуляции цельной крови и ОТП через проточную камеру наблюдались при регистрации отраженного лазерного излучения на ФД<sub>1</sub> (рис. 13Б). Блокирование GP Ib/IIIa тромбоцитов путем добавления моноклональных антител в образцы цельной крови или ОТП способствовало значительному ингибированию адгезии клеток крови к



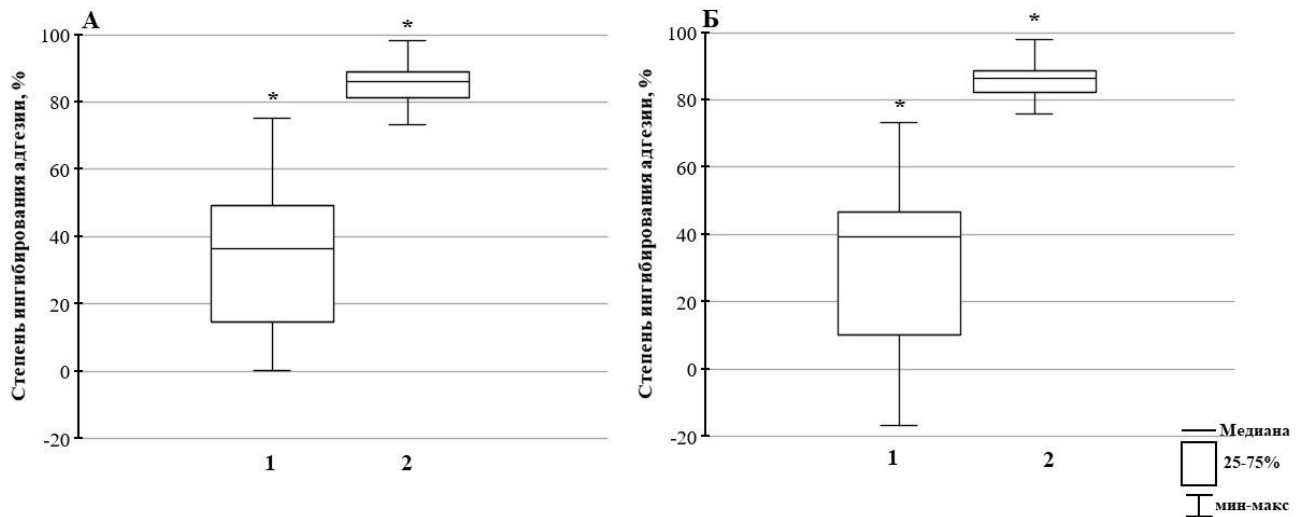
фибриногеновому покрытию в образце цельной крови и полному блокированию адгезии клеток крови к фибриногену в ОТП, что приводило к соответствующим изменениям интенсивности оптического сигнала на фотодетекторе ФД<sub>1</sub> и ФД<sub>2</sub> (рис. 13, кривые 3 и 4, соответственно).



**Рисунок 13.** Изменение интенсивности рассеянного лазерного излучения (А) и отраженного лазерного излучения (Б) при адгезии тромбоцитов к фибриногеновой подложке в условиях потока в образцах ОТП и цельной крови. Концентрация тромбоцитов в образцах ОТП и цельной крови составляла  $200 \cdot 10^3/\text{мкл}$  и  $100 \cdot 10^3/\text{мкл}$ , соответственно. **1** – цельная кровь; **2** – ОТП; **3** – цельная кровь + мАт к GP IIb/IIIa; **4** – ОТП + мАт к GP IIb/IIIa. I – интенсивность лазерного излучения рассеянного (В) и отраженного (%).

На рисунке 14 продемонстрированы статистические данные, полученные при исследовании вклада GP IIb и GP IIb/IIIa в адгезию клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови ( $n = 16$ ) здоровых добровольцев. Средняя концентрация ФВ в плазме составляла  $82 \pm 38 \%$  (табл. 1). Адгезию клеток крови в цельной крови регистрировали в течение 15-ти минут при скоростях сдвига, соответствующих артериальному руслу. Вклад GP IIb и GP IIb/IIIa рецепторов в адгезию клеток крови оценивали путем расчета степени ингибирования адгезии при блокировании этих рецепторов. Степень ингибирования адгезии клеток крови после предварительной инкубации образцов цельной крови с мАт к GP IIb составляла  $36,4 \%$  (14,2; 49,7), после добавления мАт к GP IIb/IIIa составляла  $86,1 \%$  (80,8; 89,2) при регистрации изменений интенсивности рассеянного лазерного излучения на ФД<sub>2</sub> (рис. 14А). При

регистрации изменений интенсивности отраженного лазерного излучения на ФД<sub>1</sub> степень адгезии тромбоцитов после блокирования GP Ib с помощью МАТ составляла 39,3 % (9,3; 47,1), после блокирования GP IIb/IIIa составляла 86,4 % (82,2; 89,4) (рис. 14Б).



**Рисунок 14.** Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови здоровых добровольцев при регистрации рассеянного (А) и отраженного (Б) лазерного излучения. 1 - после добавления МАТ к GP Ib; 2 - после добавления МАТ к GP IIb/IIIa.

\*-  $p < 0,05$  (Манна-Уитни тест,  $n = 16$ )

Полученные на первом этапе данные дают возможность предполагать, что разработанная методика позволяет исследовать адгезию клеток крови к фибриногеновой поверхности в образцах цельной крови здоровых добровольцев в условиях потока с помощью созданной МФС [134]. Было обнаружено, что вклад взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов в цельной крови выше, чем в ОТП. Высокий вклад взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов позволяет изучать роль этих рецепторов в адгезии клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови в условиях потока. Поэтому дальнейшие исследования адгезии клеток крови к белковым поверхностям проводились в цельной крови, а не в ОТП.

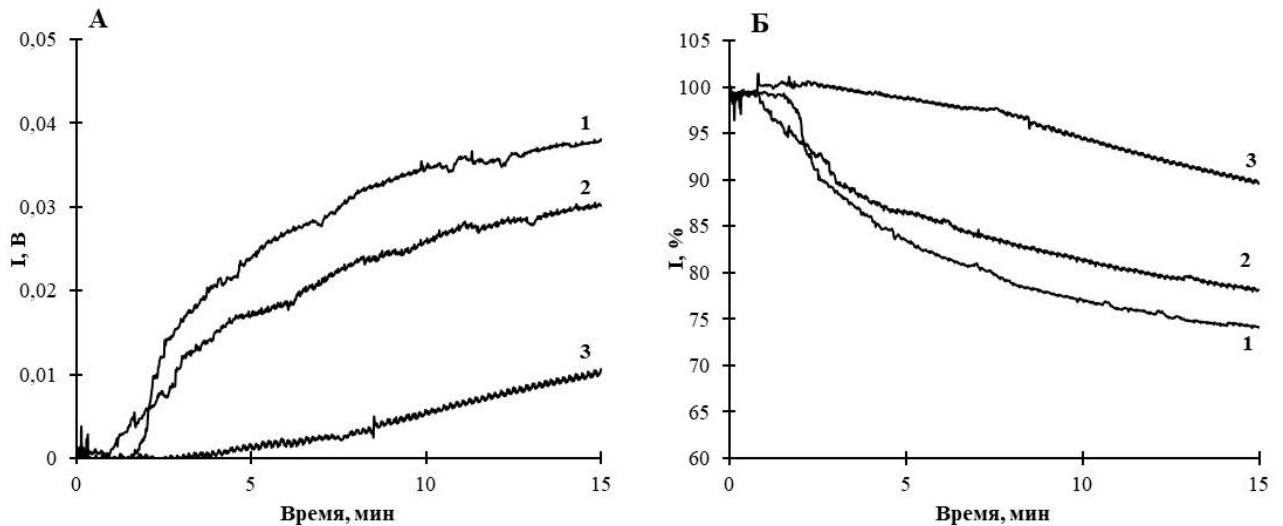
### 3.3 Адгезия клеток крови к коллагену I типа в образцах цельной крови здоровых добровольцев

Вторым этапом апробации МФС и разработанной методики было исследование адгезии клеток крови к коллагену I типа в условиях потока в образцах цельной крови здоровых добровольцев. Значение скорости сдвига для исследований на данном этапе так же не было рассчитано. Однако параметр расхода ОТП ( $Q$ ) в единицу времени, используемый для получения скорости сдвига  $1700 \text{ c}^{-1}$ , не изменялся.

Первые исследования адгезии клеток крови к коллагену были выполнены в образцах цельной крови здоровых добровольцев, антикоагулированной цитратом натрия. Однако изменений интенсивности оптических сигналов, регистрируемых на ФД<sub>2</sub> и ФД<sub>1</sub>, в опытах без добавления мАт не было. При исследовании адгезии клеток крови к коллагену I типа в цельной крови здоровых добровольцев, но уже антикоагулированной РРАСК, на обоих ФД были зарегистрированы изменения интенсивности рассеянного и отраженного лазерного излучения. Таким образом, в дальнейших опытах по исследованию адгезии клеток крови к коллагеновой поверхности была использована цельная кровь, антикоагулированная РРАСК для сохранения физиологических концентраций кальция в плазме крови.

На рисунке 15 продемонстрированы типичные кривые кинетики адгезии клеток крови к покрытой коллагеном I-го типа поверхности в цельной крови здорового добровольца, антикоагулированной РРАСК. Концентрация тромбоцитов в цельной крови составляла  $250 \cdot 10^3 / \text{мкл}$ . На представленных на рисунке 15А данных видно, что наибольшие изменения интенсивности оптического сигнала, регистрируемого на ФД<sub>2</sub>, были зарегистрированы в контрольном исследовании адгезии тромбоцитов (кривая 1, рис. 15А). Ингибирование взаимодействия GP IIb тромбоцитов и фактора фон Виллебранда с помощью мАт приводило к снижению адгезии тромбоцитов (кривая 2, рис. 15А). Блокирование GP IIb/IIIa тромбоцитов приводило к выраженному ингибированию адгезии клеток крови к коллагену (кривая 3, рис. 15А). Зеркальные изменения оптического сигнала в этих же экспериментах наблюдались при регистрации отраженного лазерного излучения на

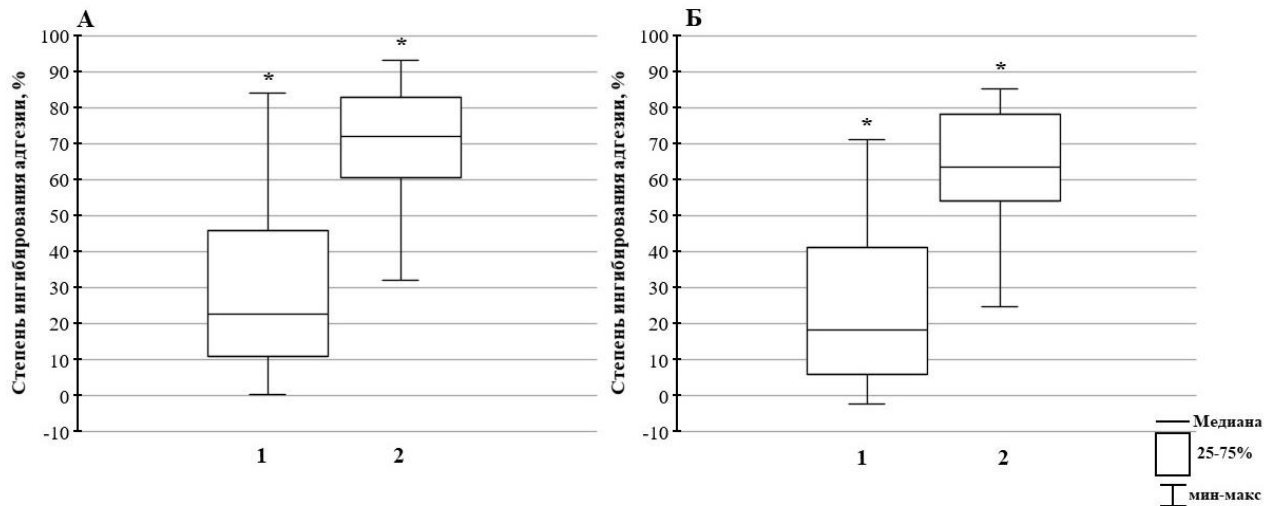
ФД<sub>1</sub> (рис. 15Б). Наибольшее изменение оптического сигнала было зарегистрировано в контрольном исследовании (кривая 1, рис. 15Б), меньшее изменение – при блокировании GP Ib рецепторов тромбоцитов (кривая 2, рис. 15Б). Блокирование GP IIb/IIIa тромбоцитов так же приводило к выраженному снижению адгезии клеток крови к коллагену и малому изменений интенсивности оптического сигнала на ФД<sub>1</sub> и ФД<sub>2</sub> (рис 15, кривые 3).



**Рисунок 15.** Изменение интенсивности рассеянного лазерного излучения (А) и отраженного лазерного излучения (Б) при адгезии клеток крови к коллагену I-го типа в условиях потока в образцах цельной крови здорового добровольца. Концентрация тромбоцитов в цельной крови –  $250 \cdot 10^3/\text{мкл}$ . **1** – цельная кровь; **2** – цельная кровь + мАт к GP Ib; **3** – цельная кровь + мАт к GP IIb/IIIa. I – интенсивность лазерного излучения рассеянного (В) и отраженного (%).

На рисунке 16 продемонстрированы статистические данные, полученные при исследовании вклада GP Ib и GP IIb/IIIa в адгезию клеток крови к коллагену I-го типа в образцах цельной крови ( $n = 17$ ) здоровых добровольцев. Средняя концентрация ФВ в плазме составляла  $82 \pm 38 \%$  (табл. 1). Адгезию клеток крови в цельной крови регистрировали в течение 15-ти минут циркуляции образцов крови через проточную камеру. Вклад GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов в адгезию клеток крови оценивали путем расчета степени ингибирования адгезии при блокировании этих рецепторов. Степень ингибирования адгезии клеток крови после предварительной инкубации образцов цельной крови с мАт к GP Ib составляла 22,8

% (10,8; 45,9), после добавления мАт к GP IIb/IIIa составляла 72,0 % (56,3; 83,7) при регистрации изменений интенсивности рассеянного лазерного излучения на ФД<sub>2</sub> (рис. 16А). При регистрации изменений интенсивности отраженного лазерного излучения на ФД<sub>1</sub> степень адгезии клеток крови после блокирования GP Ib с помощью мАт составляла 18,3 % (5,8; 43,4), после блокирования GP IIb/IIIa составляла 63,5 % (53,3; 78,5) (рис. 16Б).



**Рисунок 16.** Степень ингибирования адгезии клеток крови к коллагену типа I в образцах цельной крови здоровых добровольцев при регистрации рассеянного (А) и отраженного (Б) лазерного излучения. 1 - после добавления мАт к GP Ib; 2 - после добавления мАт к GP IIb/IIIa.

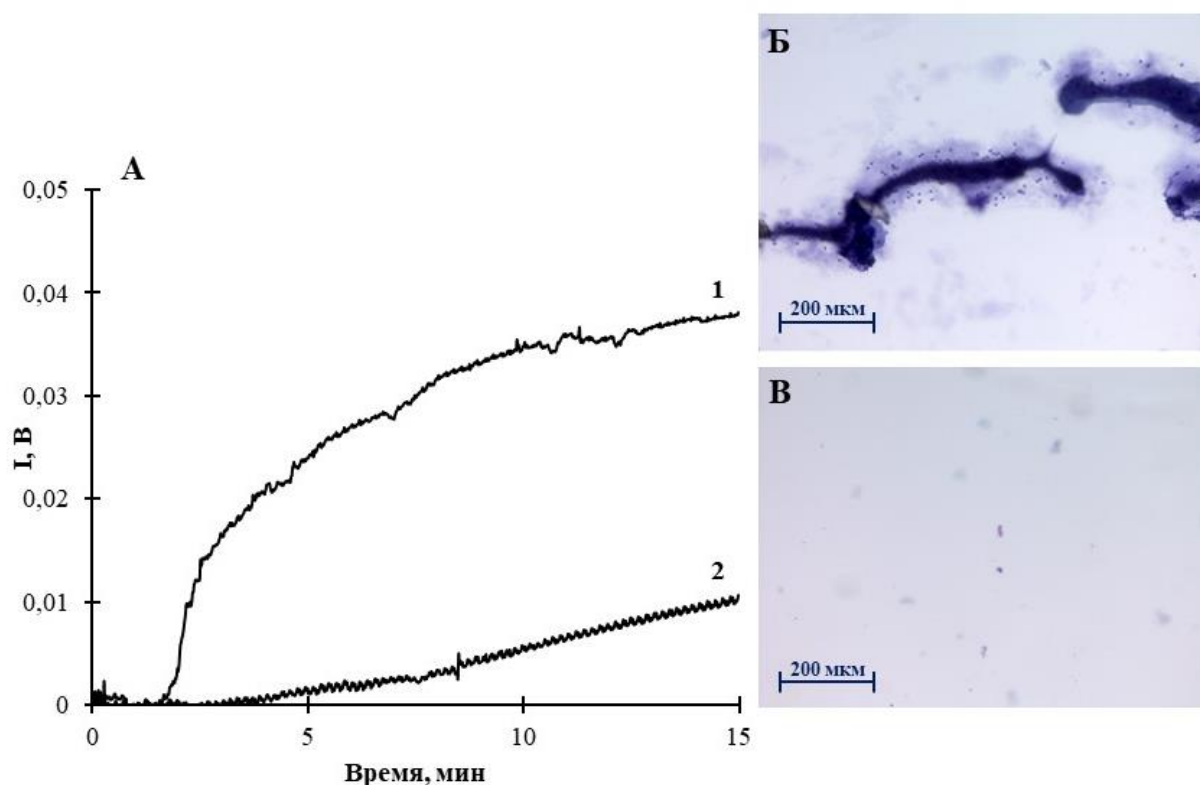
\*-  $p < 0,05$  (Манна-Уитни тест,  $n = 17$ )

Полученные на этом этапе результаты свидетельствуют о возможности исследовать адгезию клеток крови к коллагеновой поверхности в цельной крови здоровых добровольцев с помощью разработанной МФС. Покрытие оптической подложки коллагеном I типа позволяет моделировать повреждение сосудистого русла и оценивать вклад GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов в адгезию клеток крови в цельной крови в условиях потока.

### 3.4 Белково-клеточный состав структур, образующихся на поверхности проточной камеры с коллагеновым покрытием

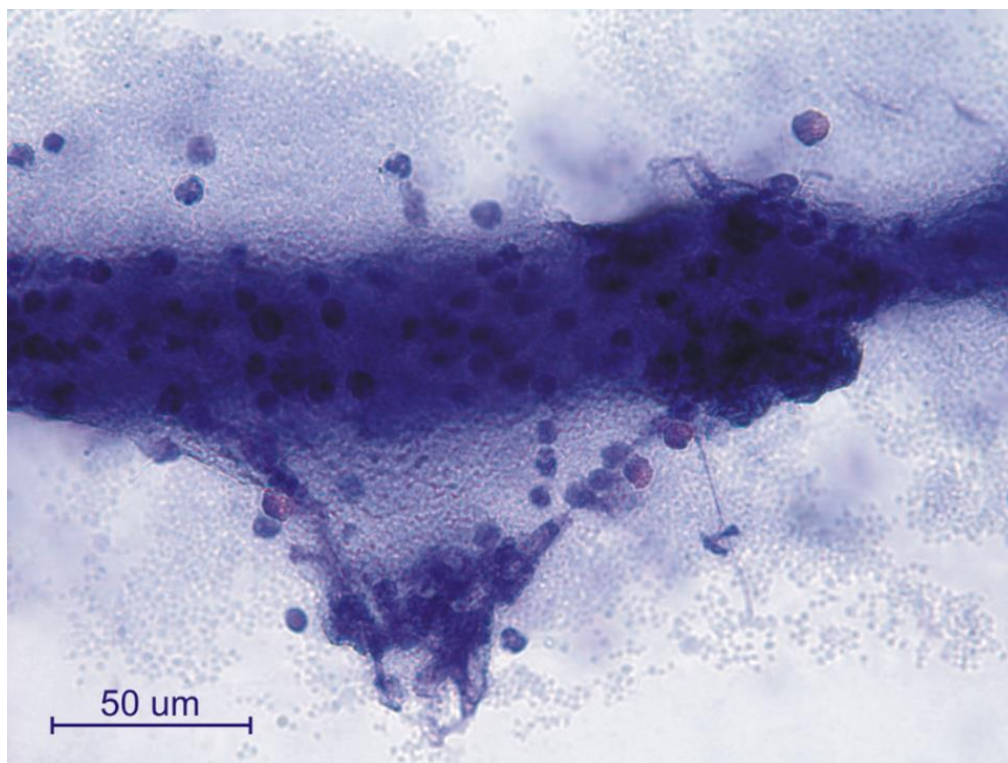
На данном этапе исследования взаимодействия клеток крови с адгезивной белковой поверхностью с помощью МФС также была проведена микроскопия

проточных камер. После 15-ти минут циркуляции цельной крови здорового добровольца, антикоагулированной в РРАСК, на коллагеновом покрытии проточной камеры образуются вытянутые структуры, которые располагаются по ходу тока крови (рис. 17). При микроскопии образцов проточных камер, окрашенных по методу Гимза, на поверхности коллагена были выявлены большие длинные белковые структуры с колокализированными лейкоцитами и тромбоцитами, вытянутые вдоль линии тока крови (рис. 17Б). После блокирования GP IIb/IIIa отложения таких структур не наблюдалось, но были обнаружены отдельно расположенные тромбоциты (рис. 17В).



**Рисунок 17.** Адгезия клеток крови к поверхности, покрытой коллагеном типа I, в цельной крови здорового добровольца при высоких скоростях сдвига. А – типичные кривые кинетики адгезии клеток крови к коллагену I типа при скорости сдвига  $1700 \text{ c}^{-1}$  (1 – цельная кровь; 2 – цельная кровь + мАт к GP IIb/IIIa); Б – белково-клеточная структура на поверхности коллагена I типа в контрольном образце, окрашенная по методу Гимза. Увеличение  $\times 100$ ; В – единичные клетки в образце с заблокированным GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов, окрашенные по методу Гимза. Увеличение  $\times 100$ .

На рисунке 18 представлена белковая структура с колокализованными тромбоцитами и лейкоцитами на поверхности коллагена I типа, образовавшаяся в контрольном образце после циркуляции цельной крови через проточную камеру со скоростью сдвига  $1700 \text{ c}^{-1}$  в течение 15-ти мин, окрашенная по методу Гимза.



**Рисунок 18.** Белковая структура с колокализованными тромбоцитами и лейкоцитами на поверхности коллагена I-го типа, образовавшаяся в контрольном образце после перфузии цельной крови через проточную камеру со скоростью сдвига  $1700 \text{ c}^{-1}$  в течение 15 мин, окрашенный по методу Гимза. Увеличение  $\times 400$ .

Далее белково-клеточные структуры, образующиеся на коллагеновой поверхности, после циркуляции цельной крови через проточную камеру, окрашивали флуоресцентными красителями (анти-ФВ-ФИТЦ, АО и DAPI). При флуоресцентной микроскопии образцов в проточной камере было визуализировано интенсивное ФВ-положительное окрашивание белковых структур (рис. 19А). В этих же ФВ-положительных областях были обнаружены тромбоциты (рис. 19Б) и лейкоциты (рис. 19В).



**Рисунок 19.** Белковая структура с колокализованными тромбоцитами и лейкоцитами на поверхности коллагена I-го типа, образовавшаяся в контрольном образце после перфузии цельной крови через проточную камеру со скоростью сдвига  $1700 \text{ с}^{-1}$  в течение 15 мин, окрашенные флуоресцентными красителями (анти-ФВ-ФИТЦ, АО, DAPI) **А** – окраска на фактор фон Виллебранда (ФВ) культуральной средой, содержащей мышинные мАт против ФВ человека и ФИТЦ-конъюгированными козьими мАт против мышинных Ат (анти-ФВ-ФИТЦ). Увеличение  $\times 400$ ; **Б** – окраска на тромбоциты акридиновым оранжевым (АО). Увеличение  $\times 400$ ; **В** – окраска на лейкоциты 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Увеличение  $\times 400$ .

В работе было продемонстрировано и уже опубликовано [135], как может происходить процесс адгезии клеток крови при высоких скоростях сдвига в местах повреждения сосудов и разрыва атеросклеротической бляшки, когда обнажаются волокна коллагена. ФВ может образовывать гиперадгезивные нити и области, обогащенные тромбоцитами и лейкоцитами.



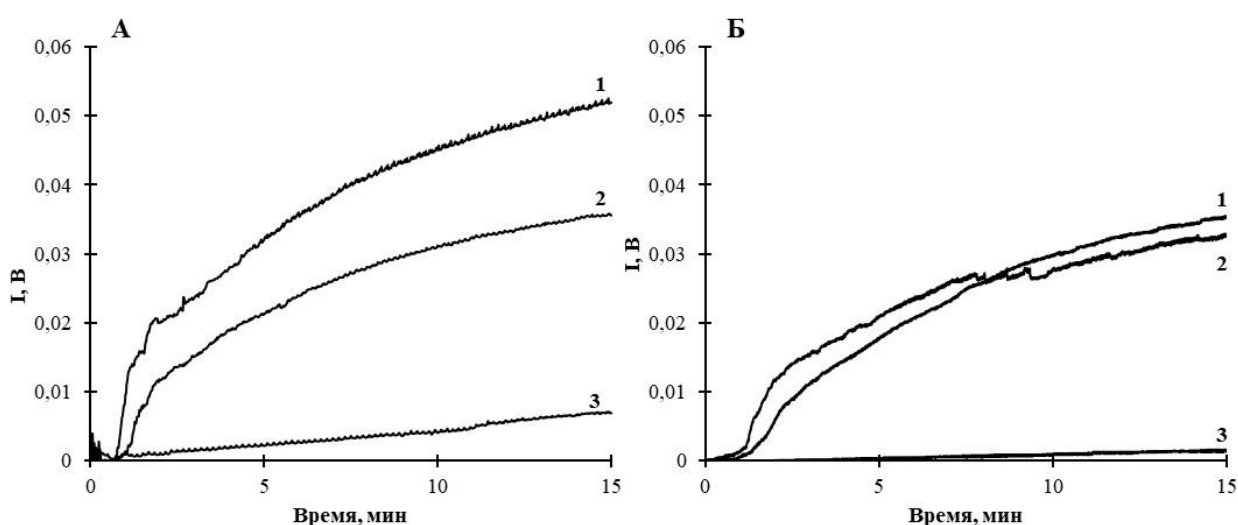
## **ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. АДГЕЗИЯ КЛЕТОК КРОВИ К ФИБРИНОГЕНОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ HEYDE, ИБС И НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19)**

В данной главе описан третий этап апробации разработанной методики для диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии. Апробация проводилась в образцах крови у пациентов с тяжелым стенозом клапана аорты и с синдромом Heyde (рис. 20, 21), ишемической болезнью сердца (рис. 22, 23) и с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) (рис. 24). У этих пациентов была исследована адгезия клеток крови к фибриногеновой поверхности в цельной крови, антикоагулированной цитратом натрия и исследован вклад GP I<sub>b</sub> и GP II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> рецепторов тромбоцитов. Исследования адгезии клеток крови на этом этапе проводились к фибриногену, так как для этих исследований был использован антикоагулянт цитрат натрия. Он давно распространен в клинических исследованиях и дешевле, чем антикоагулянт РРАСК. Тромбоциты в опытных образцах активировали 5 мкМ АДФ непосредственно перед исследованиями. Степень адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности на этом этапе оценивали только по изменению интенсивности сигнала рассеянного лазерного излучения на ФД<sub>2</sub>, так как этот фотодетектор оказался более удобным для математической обработки результатов. Вклад GP I<sub>b</sub> и GP II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> рецепторов тромбоцитов оценивали по степени ингибирования адгезии клеток крови к белковой поверхности при добавлении мАт к этим рецепторам. В таблице 1 представлены средние значения концентраций тромбоцитов и ФВ у здоровых добровольцев и пациентов, а также степень общей адгезии клеток крови к фибриногену в контрольных исследованиях без добавления мАт.

### **4.1 Адгезия клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с тяжелым аортальным стенозом и синдромом Heyde**

На данном этапе был оценен вклад GP I<sub>b</sub> и GP II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> рецепторов тромбоцитов в адгезию клеток крови к фибриногену в цельной крови пациентов с тяжелым стенозом клапана аорты (АС) и с синдромом Heyde. Значения скоростей сдвига в опытах были такие же, как и на предыдущих этапах.

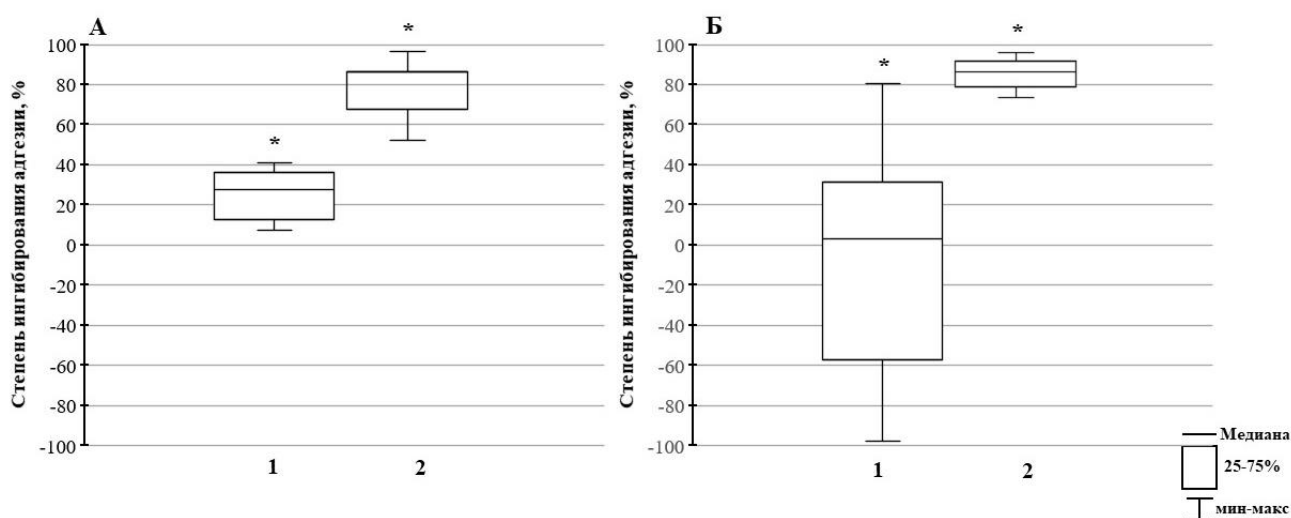
На рисунке 20 представлены типичные кривые адгезии клеток крови к покрытой фибриногеном поверхности проточной камеры в цельной крови пациента с тяжелым аортальным стенозом (АС) (рис. 20А) и с синдромом Heyde (рис. 20Б), антикоагулированной цитратом натрия. Концентрация тромбоцитов в цельной крови пациента с АС и с синдромом Heyde составляла  $308 \cdot 10^3/\text{мкл}$  и  $269 \cdot 10^3/\text{мкл}$ , соответственно. Из представленных на рисунке 20 данных видно, что блокирование взаимодействия GP Ib тромбоцитов с фактором фон Виллебранда приводит к значимому снижению адгезии клеток крови относительно контрольного исследования, когда как в случае с синдромом Heyde – адгезия клеток крови почти не изменилась (кривые 1 и 2, рис. 20). Добавление мАт к GP Пб/Ша тромбоцитов в обоих случаях приводило к почти полному блокированию адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности и слабому изменению интенсивности регистрируемого оптического сигнала на ФД<sub>2</sub> (кривые 3, рис. 20).



**Рисунок 20.** Кинетика адгезии клеток крови к фибриногену в условиях потока в образце цельной крови пациента с тяжелым аортальным стенозом (А) и синдромом Heyde (Б). Концентрация тромбоцитов в цельной крови пациента с АС и с синдромом Heyde составляла  $308 \cdot 10^3/\text{мкл}$  и  $269 \cdot 10^3/\text{мкл}$ , соответственно. **1** – цельная кровь; **2** – цельная кровь + мАт к GP Ib; **3** – цельная кровь + мАт к GP Пб/Ша. I – интенсивность лазерного излучения рассеянного (В).

На рисунке 21 продемонстрированы статистические данные, полученные при исследовании вклада GP Ib и GP Пб/Ша в адгезию клеток крови к фибриногену в

цельной крови у пациентов с тяжелым АС ( $n = 7$ ) (А) и пациентов с синдромом Heyde ( $n = 6$ ) (Б). Концентрация ФВ в плазме у пациентов с тяжелым АС составляла  $155 \pm 42 \%$ , у пациентов с синдромом Heyde  $194 \pm 81 \%$  (табл. 1). Адгезию клеток крови к фибриногену в цельной крови регистрировали в течение 15-ти минут при скоростях высоких сдвига. Блокирование GP Ib в цельной крови снижало степень адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности на 3,1 % (-75; 39,6) у пациентов с синдромом Heyde и на 24,3 % (7,6; 38,0) у пациентов с тяжелым стенозом клапана аорты (рис. 21А). Добавление мАт к GP IIb/IIIa в цельную кровь снижало степень адгезии клеток крови на 86,5 % (78; 92,4) у пациентов с синдромом Heyde и на 86,3 % (52,1; 86,6) у пациентов с тяжелым АС (рис. 21Б). Стоит отметить, что у больных с тяжелым АС ( $0,031 \pm 0,012$  В) и синдромом Heyde ( $0,019 \pm 0,013$  В) снижена степень общей адгезии клеток крови к фибриногену по сравнению со здоровыми добровольцами ( $0,046 \pm 0,021$  В) при отсутствии снижения концентрации тромбоцитов и ФВ в крови (табл. 1).



**Рисунок 21.** Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови у пациентов с тяжелым АС ( $n = 7$ ) (А) и пациентов с синдромом Heyde ( $n = 6$ ) (Б). **1** - после добавления мАт к GP Ib; **2** - после добавления мАт к GP IIb/IIIa.

\*-  $p < 0,05$  (Манна-Уитни тест)

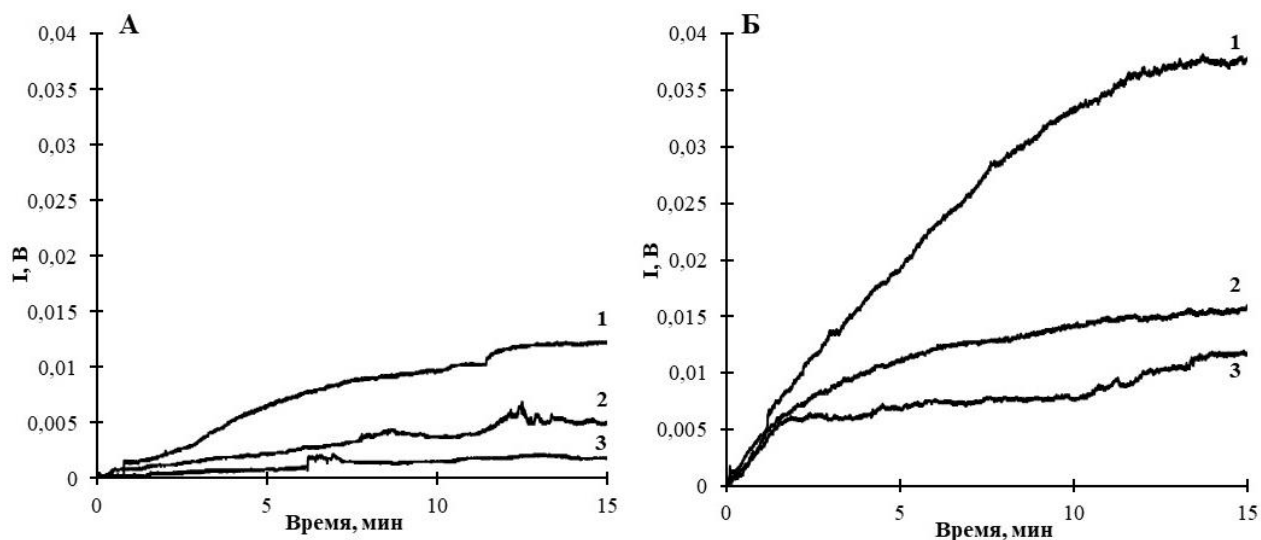
Почти полное отсутствие вклада взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов в адгезию клеток крови к фибриногену у пациентов с синдромом Heyde при

скоростях высоких сдвига может свидетельствовать о снижении количества гемостатически-активных высокомолекулярных мультимеров ФВ при отсутствии снижения количества ФВ. В результате, функциональная недостаточность ФВ может способствовать развитию желудочно-кишечных кровотечений у пациентов с синдромом Heyde. У пациентов с тяжелым АС, но без желудочно-кишечных кровотечений, вклад взаимодействия GP IIb – ФВ в адгезию клеток крови значительно выше, чем у больных с синдромом Heyde.

#### **4.2 Адгезия тромбоцитов к фибриногеновой поверхности в образцах ОТП и цельной крови пациентов с ИБС до 55 лет**

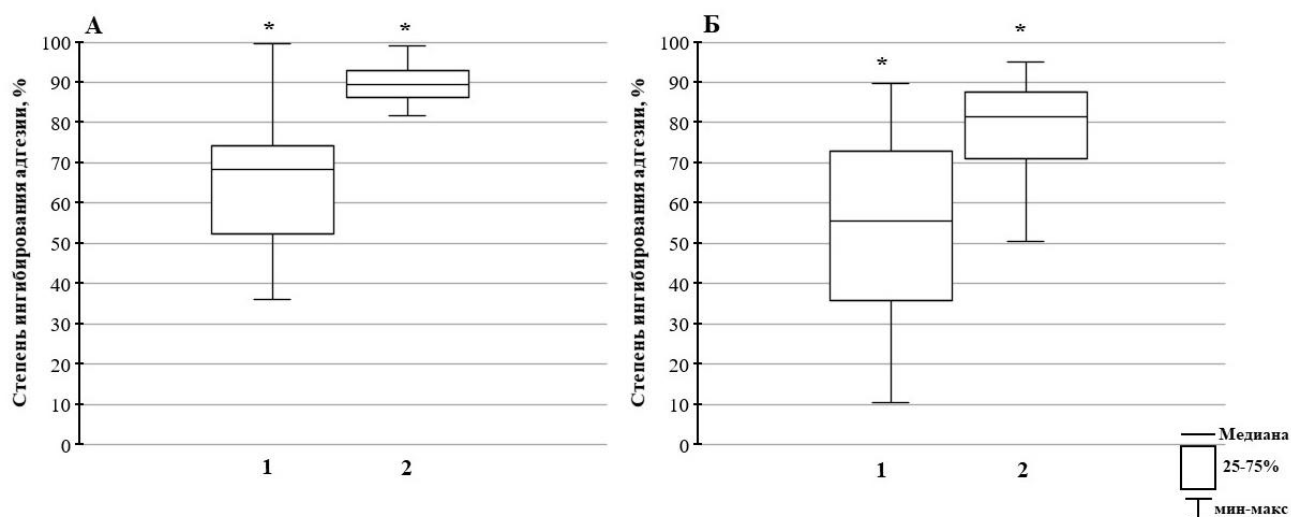
Следующий этап проверки созданной методики диагностики нарушений клеточного гемостаза состоял в оценке кинетики адгезии клеток крови на фибриногеновую поверхность в ОТП и цельной крови при скоростях сдвига, присутствующих в коронарных артериях у больных с ишемической болезнью сердца (возраст возникновения первых событий ИБС составлял 37 – 50 лет).

На рисунке 22 представлены типичные кривые кинетики адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности в образцах ОТП (рис. 22А) и цельной крови (рис. 22Б) одного и того же пациента с ИБС, антикоагулированной цитратом натрия. Концентрация тромбоцитов в ОТП и цельной крови составляла  $238 \cdot 10^3/\text{мкл}$  и  $351 \cdot 10^3/\text{мкл}$ , соответственно. Из представленных на рисунке 22 данных видно, что блокирование GP IIb рецептора тромбоцитов с приводит к выраженному снижению адгезии клеток крови относительно контрольного исследования и в ОТП, и в цельной крови (кривые 1 и 2, рис. 22). Блокирование с помощью мАт GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов в опытах с ОТП приводило почти к полному ингибированию адгезии тромбоцитов (кривая 3, рис. 22). Добавление мАт GP IIb/IIIa тромбоцитов в цельную кровь приводило к выраженному снижению адгезии клеток крови (кривая 3, рис. 22Б).



**Рисунок 22.** Кинетика адгезии клеток крови к фибриногену в условиях потока в образце ОТП (А) и цельной крови (Б) одного и того же пациента с ИБС. Концентрация тромбоцитов в ОТП и цельной крови составляла  $238 \cdot 10^3/\text{мкл}$  и  $351 \cdot 10^3/\text{мкл}$ , соответственно. **1** – цельная кровь; **2** – цельная кровь + мАт к GP Ib; **3** – цельная кровь + мАт к GP IIb/IIIa. I – интенсивность рассеянного лазерного излучения (В).

На рисунке 23 представлены статистические данные, полученные при исследовании вклада GP Ib и GP IIb/IIIa в адгезию клеток крови к фибриногену в образцах ОТП ( $n=16$ ) и цельной крови ( $n=22$ ) у пациентов с ИБС до 55 лет. Количество ФВ в плазме составляло –  $95 \pm 30$  % (табл. 1). Адгезию клеток крови к фибриногену в цельной крови регистрировали в течение 15-ти минут при скоростях сдвига, соответствующих коронарным артериям. Вклад GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов в адгезию клеток крови оценивали путем расчета степени ингибирования адгезии при блокировании этих рецепторов. Блокирование GP Ib рецепторов тромбоцитов к фактору вон Виллебранда приводило к ингибированию адгезии клеток крови у пациентов с ранней ИБС в опытах с ОТП на 60 % (14,5; 72,6), в опытах в цельной крови – на 50,5 % (27,5; 72,0) (рис. 23А). Добавление мАт к GP IIb/IIIa в образцы ОТП ингибировало адгезию клеток крови на 89,5 % (85,4; 93,2) и на 81,4 % (70,3; 87,8) при добавлении мАт к GP IIb/IIIa в образцы цельной крови (рис. 23Б).



**Рисунок 23.** Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в образцах ОТП (n = 16) (А) и цельной крови (n = 22) (Б) пациентов с ИБС до 55 лет. **1** - после добавления мАт к GP Ib; **2** - после добавления мАт к GP IIb/IIIa. \*- p < 0,05 (Манна-Уитни тест)

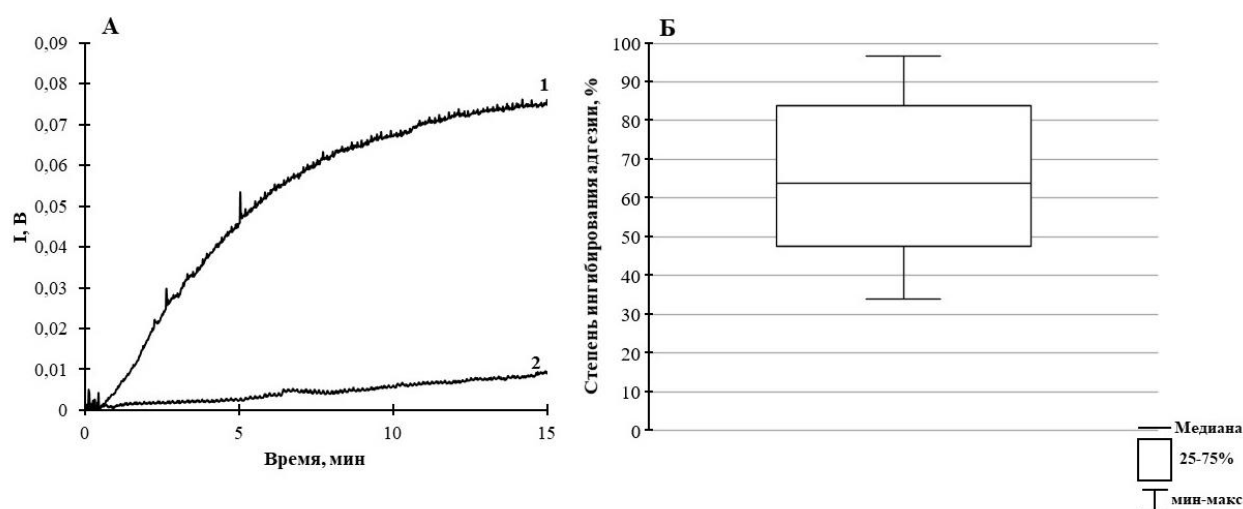
У больных с ранними эпизодами ИБС (до 55 лет) происходило значимое снижение степени адгезии клеток крови к фибриногену при блокировании GP Ib рецепторов тромбоцитов к ФВ в ОТП и цельной крови. Это свидетельствует о «разворачивании» ФВ уже при значении скорости сдвига  $1700 \text{ с}^{-1}$ . Изменение конформации ФВ при таких сдвиговых скоростях может являться новым фактором риска в развитии ИБС у молодых пациентов.

#### 4.3 Адгезия тромбоцитов к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)

На заключительном этапе проверки нашей методики для диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии была оценена кинетика адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Так же у этих пациентов был оценен вклад взаимодействия GP Ib рецепторов тромбоцитов и ФВ в адгезию клеток крови к фибриногену при скоростях сдвига, соответствующих артериальным сосудам.

На рисунке 24А продемонстрированы типичные кривые кинетики адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови пациента с тяжелым течением

COVID-19 при скорости сдвига, соответствующей артериальным сосудам. Концентрация тромбоцитов в цельной крови составляла  $78 \cdot 10^3/\text{мкл}$ . Из представленных данных видно, что блокирование взаимодействия GP IIb тромбоцитов и ФВ с помощью мАТ приводило к почти полному подавлению адгезии клеток крови к фибриногену (кривая 1, рис. 24А) по сравнению с контрольным исследованием (кривая 2, рис. 24А).



**Рисунок 24.** А. Адгезия клеток крови к фибриногену при скорости сдвига, соответствующей артериальным сосудам, в цельной крови пациента с тяжелым течением COVID-19. Концентрация тромбоцитов в цельной крови пациента с COVID-19 составляла  $78 \cdot 10^3/\text{мкл}$ . **1** – цельная кровь; **2** – цельная кровь + мАТ к GP IIb. Б. Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови ( $n = 17$ ) у пациентов с тяжелым течением COVID-19. I – интенсивность рассеянного лазерного излучения (В).

На рисунке 24Б представлены статические данные, полученные при исследовании вклада взаимодействия GP IIb тромбоцитов и ФВ в адгезию клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови ( $n=17$ ) у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Средняя концентрация ФВ в плазме составляла  $533 \pm 214$  % (табл. 1). Адгезию клеток крови к фибриногену в цельной крови регистрировали в течение 15-ти минут при скоростях сдвига, соответствующих коронарным артериям. Вклад GP IIb рецепторов в адгезию клеток крови оценивали путем расчета степени ингибирования адгезии при блокировании этих рецепторов. Блокирование

взаимодействия GP Ib рецепторов тромбоцитов и фактора фон Виллебранда у пациентов с тяжелым течением COVID-19 приводило к подавлению адгезии клеток крови на 63,9 % (47,5; 83,8), в то время как у здоровых добровольцев на 39,3 % (9,3; 47,1),  $p=0,002$  (U-критерий Манна-Уитни). Из данных, представленных в таблице 1, видно, что у больных с COVID-19 средние значения степени общей адгезии клеток крови ( $0,047 \pm 0,03$  В) примерно равны с данными, полученными у здоровых добровольцев ( $0,046 \pm 0,021$  В), несмотря на значительное увеличение вклада взаимодействия GP Ib – ФВ в адгезию клеток крови.

При исследовании адгезии клеток крови к фибриногену у больных с новой коронавирусной инфекцией был обнаружен наибольший вклад взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов. Также эти данные были ассоциированы со значительным повышением ФВ в плазме. Полученные на данном этапе результаты, не противоречат данным литературы об участии ФВ в развитии гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19 [93, 95].

**Таблица 1.** Количество тромбоцитов, концентрация антигена фактора фон Виллебранда (ФВ) и степень общей адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови в контрольных исследованиях у здоровых добровольцев и пациентов с синдромом Heyde, тяжёлым аортальным стенозом (АС), ишемической болезнью сердца (ИБС) и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

	Heyde	АС	Здоровые	ИБС	COVID-19
Тромбоциты, $\cdot 10^3/\text{мкл}$	$173 \pm 72$	$205 \pm 59$	$174 \pm 55$	$228 \pm 94$	$167 \pm 68$
ФВ:Аг, %	$194 \pm 81$	$155 \pm 42$	$82 \pm 38$	$95 \pm 30$	$533 \pm 214$
Степень общей адгезии (I, В)	$0,019 \pm 0,013$	$0,031 \pm 0,012$	$0,046 \pm 0,021$	$0,023 \pm 0,011$	$0,047 \pm 0,03$

Данные предоставлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение



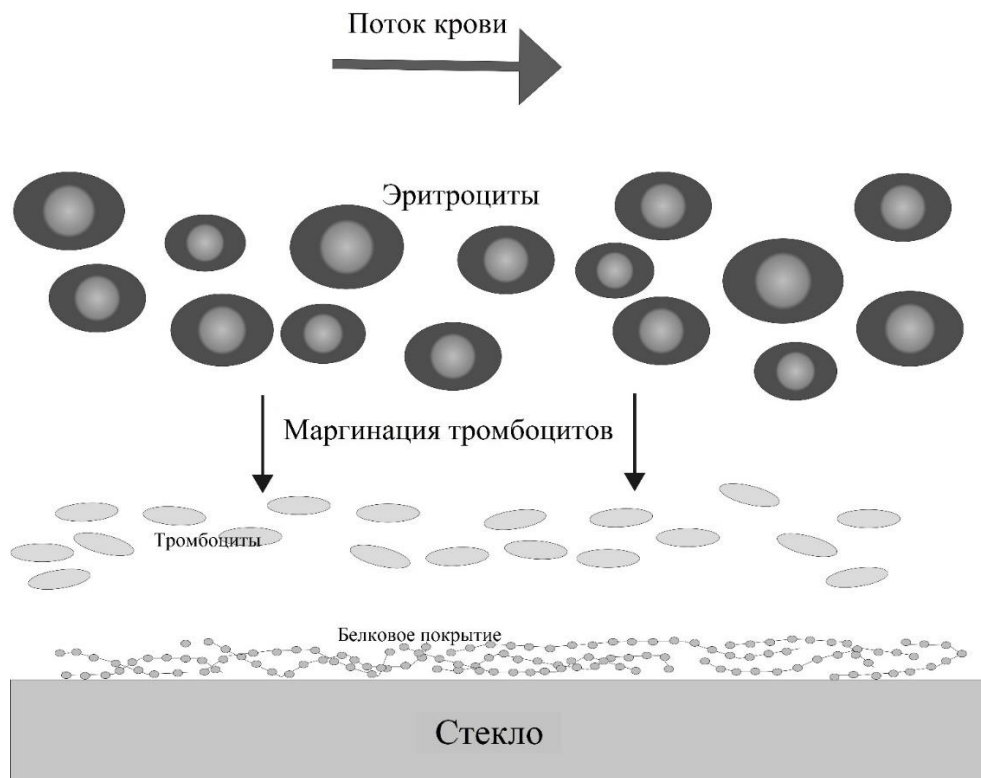
## ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В диссертационной работе представлены результаты апробации разработанной нами методики для диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии. Принцип методики заключается в том, что лазерное излучение, падающее на границу оптических сред стекло–плазма крови при углах падения более критического, полностью отражалось от поверхности оптической подложки по закону полного внутреннего отражения и регистрировалось фотодетектором ФД<sub>1</sub>. Тем не менее, отраженный свет проникал в образец крови или ОТП за зону отражения на глубину примерно 400 нм и при адгезии клеток крови к оптической подложке, покрытой белком, взаимодействовал с клетками крови, вызывая изменения интенсивности отраженного и рассеянного излучения, которые регистрировались двумя фотодетекторами (ФД<sub>1</sub> - интенсивность отраженного света, ФД<sub>2</sub> - интенсивность рассеянного света).

Результаты, полученные на первом этапе исследования, дают возможность судить об эффективности моделирования условий потока крови для изучения адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности как в образцах ОТП, так и в образцах цельной крови здоровых добровольцев [136]. При сравнении результатов, полученных в образцах ОТП и цельной крови одних и тех же исследуемых образцов было обнаружено, что происходит значительное увеличение интенсивности рассеянного излучения, регистрируемого на ФД<sub>2</sub>, и снижение регистрируемого отраженного лазерного излучения на ФД<sub>1</sub> после начала потока цельной крови через проточную камеру по сравнению с ОТП. В обоих случаях, когда была использована цельная кровь и ОТП, блокирование GP IIb/IIIa, рецептора фибриногена тромбоцитов, путем добавления моноклональных антител приводило к значительному или полному ингибированию адгезии клеток крови и соответствующим изменениям интенсивности оптического сигнала, зарегистрированных на обоих фотодетекторах.

Факт увеличения интенсивности адгезии клеток крови к белковому покрытию в образцах цельной крови по сравнению с образцами ОТП требует отдельного объяснения и анализа. Здесь важны два основных явления,

наблюдаемые при использовании цельной крови по сравнению с плазмой. Во-первых, в отличие от плазмы крови, образцы цельной крови ведут себя как неньютоновская жидкость. В результате реальные значения скоростей сдвига оказываются другими в случае цельной крови [107]. Согласно приблизительной оценке, если скорость сдвига, рассчитанная для ОТП, составила  $1700 \text{ с}^{-1}$ , то оценочная величина скорости сдвига в цельной крови будет в 7-10 раз выше, примерно  $9\ 000 - 17\ 000 \text{ с}^{-1}$ . Второй важный момент заключается в том, что когда цельная кровь движется вдоль плоской поверхности при высоких скоростях сдвига, а наша проточная камера имеет плоскую подложку для взаимодействия тромбоцитов с белковым покрытием, более крупные эритроциты, которые сосредотачиваются в центре потока, оттесняют к пристеночной области тромбоциты (margination) [137]. Это явление подробно описано ранее, и было показано, что высокие скорости сдвига в кровотоке повышают маргинацию тромбоцитов к сосудистой стенке [133]. Усиленная диффузия и маргинация влияют на транспорт тромбоцитов к стенке сосуда, и основным результатом этого является увеличение локальной концентрации тромбоцитов в непосредственной близости от поверхности оптической подложки (рисунок 25). Оба эти явления приводят к значительному увеличению интенсивности взаимодействия тромбоцитов с покрытой белком поверхностью проточной камеры. Приготовление ОТП из цельной крови требует значительных временных затрат, увеличивает вероятность ошибки на этапе пробоподготовки и существенно уменьшает объем исследуемого образца. Также исследования адгезии клеток крови в образцах цельной крови дают возможность моделировать более высокие, по сравнению с ОТП, скорости сдвига, что увеличивает вклад GP Ib – ФВ в адгезивные реакции. Поэтому последующие этапы работы выполнены на образцах цельной крови.



**Рисунок 25.** Схематическая иллюстрация маргинации (margination) тромбоцитов в цельной крови в условиях потока.

Возможность изучения роли рецепторов к фактору Виллебранда GP Ib и рецепторов к фибриногену GP IIb/IIIa при адгезии клеток крови к фибриногеновому покрытию в образцах цельной крови в условиях потока является важным подходом в апробации микрофлюидной системы. В многочисленных исследованиях подробно описывается взаимодействие тромбоцитов с поверхностно-адсорбированными белками, а именно фибриногеном, фактором фон Виллебранда, альбумином [138, 139]. В статических условиях или условиях с низкими скоростями сдвига ключевая роль в адгезии тромбоцитов принадлежит фибриногену, он опосредует взаимодействие тромбоцитов с адгезивной поверхностью и регулируется рецептором GP IIb/IIIa. При высоких скоростях сдвига на первый план выходит опосредующее влияние на адгезию клеток крови фактора фон Виллебранда, которое в большей степени регулируется активностью и доступностью домена, связывающегося с рецептором GP Ib на поверхности тромбоцитов [140]. Переход от фибриноген-опосредованной к опосредованной

фактором фон Виллебранда адгезии клеток крови к фибриногеновому покрытию может быть продемонстрирован экспериментально с помощью апробированной микрофлюидной системы, при сравнении результатов, полученных в ОТП и цельной крови. Нами установлено, что адгезия клеток крови в цельной крови при артериальных скоростях сдвига зависит от связывания тромбоцитов с ФВ через рецептор GP Ib. Блокирование рецептора мАт GP Ib тромбоцитов достоверно приводило к снижению адгезии клеток крови на 36,4 % в цельной крови, тогда как при тех же условиях в ОТП снижение адгезии клеток крови было 19,6 %.

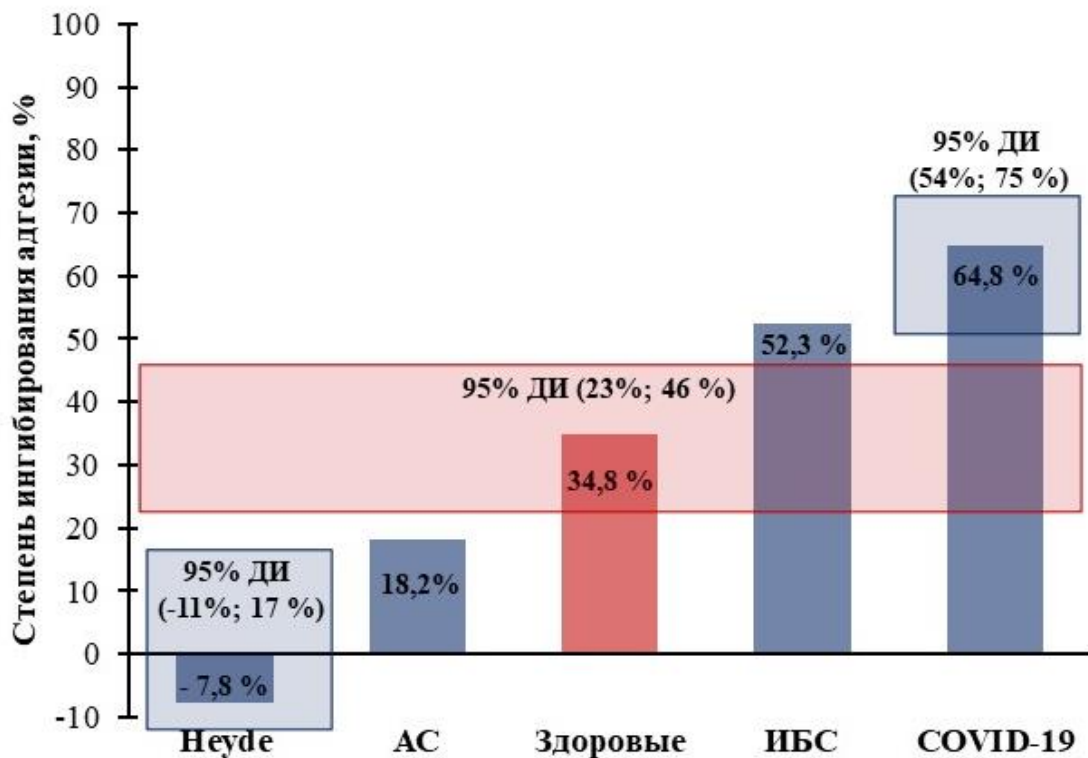
В работе также было продемонстрировано, как может происходить процесс адгезии клеток крови при высоких скоростях сдвига в местах повреждения сосудов и разрыва атеросклеротической бляшки, когда обнажаются волокна коллагена. При световой микроскопии, в том числе флуоресцентной, было показано, что в результате взаимодействия цельной крови с коллагеновой поверхностью в проточной камере микрофлюидной системы при высоких скоростях сдвига образуются вытянутые вдоль тока крови структуры. Эти структуры состоят из тромбоцитов, ФВ и лейкоцитов. ФВ образует гиперадгезивные области, обогащенные тромбоцитами и лейкоцитами. Способность ФВ образовывать области, подобные паутине, позволяет ему служить субстратом для активного рекрутирования лейкоцитов для их последующей экстравазации в поврежденную область при высоких скоростях сдвига, при которых только одни лейкоциты не могут прочно адгезировать к стенке сосуда [141]. Важность ФВ для рекрутирования лейкоцитов и экстравазации была показана в ряде исследований [142-144]. Результаты, полученные в работе, также демонстрируют, что комплексное взаимодействие GP Ib/IIIa тромбоцитов и ФВ необходимо в процессе рекрутирования лейкоцитов и тромбоцитов в цельной крови при высоких скоростях сдвига. Об этом факте свидетельствует ингибирование адгезии клеток крови к коллагену на 72 % при добавлении мАт к GP Ib/IIIa и отсутствие образования вытянутых структур в проточной камере при микроскопии.

В последние годы появляется все больше данных, что тромбоциты не только осуществляют нормальный гемостаз и участвуют в развитии тромботических

осложнений, но и играют важную роль в развитии воспалительных заболеваний [145]. Традиционно считалось, что тромбообразование с привлечением тромбоцитов к месту повреждения сосудистой стенки и иммунный ответ с привлечением лейкоцитов в воспаленных тканях это два разных пути. Однако сегодня известно, что в одних случаях тромбоциты способствуют воспалительным процессам, а в других - воспаление вызывает тромбоз. Для описания взаимодействия между воспалительными и тромбоцитарными механизмами при артериальных и венозных заболеваниях, включая тромбоз глубоких вен и инфекции используется термин «тромбо-воспаление» [146]. Термин «тромбо-воспаление» был введен в 2020 году на Третьей Маастрихтской консенсусной конференции по тромбозам для описания сложного взаимодействия между свертыванием крови и воспалением [146]. Фактор фон Виллебранда может представлять собой возможный «связующий мост» между гемостатическим и воспалительным путями, опосредующий адгезию и рекрутирование как тромбоцитов, так и лейкоцитов. Этот «связующий мост» - процесс, состоящий из активации эндотелия, секреции мультимеров ФВ, разворачивании и расщепления ADAMTS-13, построении гиперадгезивных нитей ФВ, а также ФВ-опосредованной адгезии тромбоцитов [5]. Этот механизм, возможно, способствует тромбозу как мелких, так и крупных сосудов. ФВ и его роль в тромбовоспалении участвуют в развитии артериального и венозного тромбоза, в том числе атеротромбоза и инсульта [5, 147]. Изучение этого механизма может определить новые мишени для профилактики и лечения атеротромботических осложнений.

На последующем этапе апробации разработанной методики диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии был исследован вклад взаимодействия ФВ и GP IIb тромбоцитов в адгезию клеток крови к фибриногену в цельной крови у пациентов с синдромом Heude, тяжелым стенозом клапана аорты, ранней ИБС (возникновение первых событий ИБС до 55 лет) и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Данные, представленные на рисунке 26, демонстрируют, что созданная методика регистрации адгезии клеток

крови к белковому покрытию в условиях потока эффективна и дает возможность исследовать нарушения клеточного гемостаза у больных с различной патологией.



**Рисунок 26.** Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену при блокировании GP IIb рецепторов тромбоцитов в цельной крови здоровых добровольцев и пациентов с синдромом Heude, тяжелым стенозом клапана аорты, ранней ИБС и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Для каждой группы (здоровые добровольцы и пациенты) представлены средние значения. ДИ – доверительный интервал ( $p < 0,01$ , тест Краскела-Уоллиса).

Снижение и отсутствие выраженного вклада ФВ в адгезию клеток крови к фибриногену при высоких скоростях сдвига у пациентов с тяжелом AC и с синдромом Heude, соответственно, может свидетельствовать о снижении количества гемостатически-активных высокомолекулярных мультимеров ФВ (приобретенный синдром Виллебранда), при отсутствии снижения количества ФВ в плазме. Гидродинамическая активация ФВ в диапазоне высоких скоростей сдвига и последующая его инактивация металлопротеиназой ADAMTS-13 может приводить к функциональной недостаточности ФВ и, как результат, к развитию

желудочно-кишечных кровотечений у пациентов с синдромом Heyde. По литературным данным у 70 – 80% больных с тяжелым стенозом клапана аорты наблюдается снижение ВМФВ в плазме, а у 7 – 20 % больных – в следствие снижения ВМФВ развиваются желудочно-кишечные кровотечения [8].

Таким образом, результаты, полученные в исследовании, не противоречат данным других исследователей. Стоит отметить, что концентрация ФВ в плазме у пациентов с тяжелым АС (194 %) и синдромом Heyde (155 %) был выше, чем у здоровых добровольцев (99 %). Однако, его вклад в адгезию клеток крови к фибриногену у больных – значительно ниже, чем у здоровых добровольцев. Следовательно, разработанная методика для диагностики нарушения клеточного гемостаза позволит в будущем обеспечить более полное исследование распространенности приобретенного синдрома Виллебранда в различных популяциях, а также может быть применена для тестирования новых препаратов, модулирующих процесс само-ассоциации ФВ независимо от процесса протеолиза ADAMTS-13.

У пациентов с ранней ИБС (первые эпизоды ИБС до 55 лет) адгезия клеток крови к фибриногену в условиях скоростей сдвига, соответствующих коронарным артериям, была оценена в образцах ОТП и цельной крови. Ингибирование адгезии клеток крови к фибриногену на 60 % при блокировании GP Ib рецепторов тромбоцитов к фактору вон Виллебранда в образцах ОТП может свидетельствовать о «разворачивании» фактора вон Виллебранда уже при значении скорости сдвига  $1700 \text{ c}^{-1}$ . В цельной крови блокирование взаимодействия ФВ и GP Ib рецепторов тромбоцитов также приводило к значимому ингибированию адгезии клеток крови (на 50,5 %). Изменение конформации фактора вон Виллебранда при сдвиговых скоростях ниже пороговых ( $<5000 \text{ c}^{-1}$ ) может являться новым фактором риска в развитии ИБС у молодых пациентов. Для активации и правильного функционирования ФВ необходимы высокие скорости сдвига, что необходимо учитывать в будущих исследованиях роли ФВ в развитии тромботических осложнений ИБС.

Следует отметить, что в настоящее время не существует практически терапевтических средств против ФВ одобренных для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Единственный препарат, блокирующий ФВ, одобренный для клинического использования – каплацизумаб [148]. Каплацизумаб представляет собой гуманизированное двухвалентное нано антитело, которое специфически связывается с сайтом связывания GPIIb в домене A1 ФВ. Исследования безопасности и эффективности каплацизумаба у пациентов с ИБС немногочисленны, что не в последнюю очередь связано с отсутствием соответствующих методик. Нет сомнения, что разработка микрофлюидных систем и методики оценки адгезии клеток крови к белковой поверхности жизненно необходима для поиска и проверки эффективности новых препаратов для лечения ИБС, влияющих на активность ФВ.

Результаты, полученные в исследовании адгезии клеток крови к фибриногену в условиях потока в цельной крови пациентов с COVID-19 подтвердили важную роль фактора фон Виллебранда в «тромбо-воспалительном» каскаде патогенеза тяжёлой формы COVID-19. Из полученных данных видно, что вклад ФВ в адгезию клеток крови к фибриногену у пациентов с новой коронавирусной инфекцией значительно превышает вклад ФВ в адгезию клеток крови к фибриногену у здоровых добровольцев. Так же у этих больных было значительно повышено количество ФВ в плазме. Повышение ФВ в плазме было отмечено и другими исследователями [94]. Таким образом, растёт понимание того, что COVID-19 может запускать «тромбо-воспалительный» каскад, в котором важную роль играет ФВ. Сверхбольшие мультимеры ФВ, высвобождаемые из телец Вейбеля-Паладе, разворачиваются при более низких скоростях сдвига и, следовательно, образуют гиперадгезивную сеть по типу «паутины», захватывающую тромбоциты и лейкоциты. Описанный выше процесс рекрутирования тромбоцитов и лейкоцитов, приводит к развитию микротромбов, которые определяются в большом количестве у умерших от COVID-19 пациентов. У большей части пациентов в исследовании был зафиксирован летальный исход от осложнений новой коронавирусной инфекции (COVID-19).



Полученные на заключительном этапе исследования результаты имеют важное значение для лечения COVID-19 и его осложнений. Например, каплацизумаб, блокирующий взаимодействие ФВ и GP Ib тромбоцитов, может быть эффективен в предотвращении развития тромботических осложнений у пациентов с повышенным уровнем ФВ в плазме. Еще одним соединением, который может быть применён у пациентов с COVID-19, является анфибатид. Его механизм действия аналогичен механизму действия каплацизумаба и его эффективность необходимо также исследовать [149].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система свертывания крови одна из наиболее сложных физиологических систем организма человека. Нарушение ее баланса встречается очень часто при самых разных патологических или даже физиологических ситуациях (травмы, инфекционные заболевания и сепсис, онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, хирургические операции и беременность) и приводит к кровотечениям или жизнеугрожающим тромбозам. Для профилактики и лечения нарушений системы гемостаза назначается антикоагулянтная и гемостатическая терапия. Понимание работы этой сложной системы может дать ключ к разработке более эффективных методов и подходов при профилактике и терапии нарушений гемостаза. Имеющиеся антитромботические препараты воздействуют не только на патологическое тромбообразование, но и на физиологический гемостаз, что повышает риск кровотечений. На сегодняшний день существует потребность в поиске новых стратегий, ингибирующие патологические процессы тромбообразования без нарушения нормального гемостаза. Исходя из полученных в данной работе результатов можно предположить, что фактор фон Виллебранда или GP Ib тромбоцитов могут стать перспективной мишенью для антитромбоцитарной или гемостатической терапии. Поэтому исследование тромбообразования, в частности, адгезии клеток крови к белковой поверхности, необходимо проводить в условиях контролируемого потока с возможностью получения различных значений скоростей сдвига.

Многие стандартизированные *in vitro* технологии исследования гемостаза, в частности тромбоцитарного звена, выполняются в статических условиях или при низких скоростях сдвига. Они включают в себя: исследование агрегации тромбоцитов, проточную цитофлуориметрию мембранных маркеров активации, сканирующую электронную микроскопическую оценку расплывания тромбоцитов, ретракцию сгустка и вестерн-блот-анализ фосфорилирования белков тромбоцитов, участвующих в трансдукции внутриклеточного сигнала. Физиологическая значимость многих из этих анализов может быть поставлена под

сомнение, так как их статический характер не учитывает определенные критические взаимодействия, например, взаимодействие GP Ib и фактора фон Виллебранда, имеющее существенное значение при высоких скоростях сдвига. В целом, микрофлюидные технологии предлагают уникальное сочетание физиологических условий и требований к небольшим объемам крови, используемой для оценки адгезии клеток крови к белковым поверхностям, которые могут персонализировать диагностику нарушения свертывания крови и мониторинг антитромбоцитарной терапии. Однако существенным недостатком используемых на сегодняшний день методик является трудоемкость оценки адгезировавших клеток крови с помощью микроскопии и детектирования полученных результатов, а также высокая стоимость оборудования.

Будущее развития диагностики нарушений клеточного гемостаза зависит от разработки дешевых и нетрудоемких систем для анализа биологических образцов непосредственно у кровати пациента. Если тест на функциональную оценку тромбоцитов можно выполнить и получить результаты в течение 30-ти минут, то он может найти широкое применение в клинической практике.

В данном исследовании разработана методика для диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии, которая может стать эффективным инструментом для изучения кинетики адгезии клеток крови к поверхностям, покрытым адгезивным белком, в условиях контролируемого потока. Для того чтобы проверить разработанную методику и возможность ее применения для анализа адгезии клеток крови у пациентов, вначале была произведена оценка адгезии клеток крови к поверхности, покрытой фибриногеном или коллагеном, в обогащенной тромбоцитами плазме и цельной крови здоровых добровольцев. Далее возможность применения разработанной методики была оценена при анализе адгезии клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с синдромом Heyde, тяжелым стенозом клапана аорты, ИБС и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности регистрации с помощью микрофлюидной системы кинетики адгезии клеток крови к белковым

поверхностям (фибриноген, коллаген) при движении через проточную камеру ОТП и цельной крови в реальном времени. Для измерения адгезии клеток крови к белковой подложке очень важно «зондировать» тонкий пристеночный слой плазмы крови. Это оказалось возможным благодаря детекции только «прилипших» клеток крови к оптической подложке, покрытой белком, в новой микрофлюидной системе. Необходимо добавить, что разработанная методика диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии дает возможность оценки адгезии клеток крови в реальном времени без использования трудоемких и дорогих методов микроскопии. Для детектирования результатов нет необходимости проводить трудоемкую и требующую больших временных затрат пробоподготовку образцов, которая занимает длительное время.

## ВЫВОДЫ

Полученные в ходе диссертационной работы результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Создана микрофлюидная система, позволяющая в реальном времени регистрировать кинетику адгезии клеток крови к поверхностям, покрытых фибриногеном или коллагеном типа I, в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови в условиях контролируемого потока.
2. Обнаружено, что в микрофлюидной системе в результате взаимодействия образцов крови с поверхностью, покрытой коллагеном I типа, в условиях потока, образуются белково-клеточные структуры, которые состоят из тромбоцитов и фактора фон Виллебранда с многочисленными включениями лейкоцитов.
3. У больных с синдромом Heyde, при отсутствии снижения общего уровня фактора фон Виллебранда в плазме, почти отсутствовал вклад взаимодействия GP Ib и фактора фон Виллебранда в адгезию клеток крови к фибриногену в условиях потока.
4. При исследовании крови больных с ишемической болезнью сердца был обнаружен повышенный вклад фактор фон Виллебранда – GP Ib зависимых реакций в адгезию клеток крови к фибриногену в потоке ( $\approx 50\%$ ) при нормальном плазменном уровне фактора фон Виллебранда.
5. У больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) был выявлен максимальный вклад взаимодействия GP Ib и фактора фон Виллебранда ( $\approx 60\%$ ) в адгезию клеток крови к фибриногену в условиях потока, который ассоциировался со значительным повышением уровня фактора фон Виллебранда в крови.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Проведенное исследование и его результаты позволяют сформулировать ряд практических рекомендаций врачам клинической лабораторной диагностики, врачам-гематологам:

1. Исследование адгезии клеток крови к белковой поверхности в потоке целесообразно проводить в образцах цельной крови, а не обогащенной тромбоцитами плазмы в связи с более выраженным вкладом взаимодействия GP IIb и фактора фон Виллебранда, зависящих от условий потока.
2. Для оценки адгезии клеток крови к коллагену I типа в условиях потока цельную кровь необходимо антикоагулировать в РРАСК (прямой ингибитор тромбина) для сохранения физиологических концентраций свободного кальция.
3. Разработанная микрофлюидная система может быть использована для выявления и мониторинга нарушений общей адгезии клеток крови к фибриногену и зависимых от взаимодействия GP IIb и фактора фон Виллебранда адгезивных реакций у больных с синдромом Heude, ишемической болезнью сердца и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ruggeri Z.M. Platelet adhesion under flow // *Microcirculation* (New York, NY : 1994) — 2009. — Vol. 16, N 1. — P. 58-83.
2. Chen Y., Ju L.A. Biomechanical thrombosis: the dark side of force and dawn of mechano-medicine // *Stroke and vascular neurology* — 2020. — Vol. 5, N 2. — P. 185-197.
3. Trevisan B.M., Porada C.D., Atala A., Almeida-Porada G. Microfluidic devices for studying coagulation biology // *Seminars in cell & developmental biology* — 2020. — Vol. 112. — P. 1-7.
4. Löf A., Müller J.P., Brehm M.A. A biophysical view on von Willebrand factor activation // *Journal of cellular physiology* — 2018. — Vol. 233, N 2. — P. 799-810.
5. Chen J., Chung D.W. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13 // *Blood* — 2018. — Vol. 132, N 2. — P. 141-147.
6. Schneider S.W., Nuschele S., Wixforth A., Gorzelanny C., Alexander-Katz A., Netz R.R., Schneider M.F. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* — 2007. — Vol. 104, N 19. — P. 7899-7903.
7. Chen Y., Ju L.A., Zhou F., Liao J., Xue L., Su Q.P., Jin D., Yuan Y., Lu H., Jackson S.P. *et al* An integrin  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$  intermediate affinity state mediates biomechanical platelet aggregation // *Nature materials* — 2019. — Vol. 18, N 7. — P. 760-769.
8. Blackshear J.L. Heyde Syndrome: Aortic Stenosis and Beyond // *Clinics in geriatric medicine* — 2019. — Vol. 35, N 3. — P. 369-379.
9. Calmette L., Clauser S. [Von Willebrand disease] // *La Revue de medecine interne* — 2018. — Vol. 39, N 12. — P. 918-924.
10. Kato Y., Iwata A., Futami M., Yamashita M., Imaizumi S., Kuwano T., Ike A., Sugihara M., Nishikawa H., Zhang B. *et al* Impact of von Willebrand factor on coronary plaque burden in coronary artery disease patients treated with statins // *Medicine* — 2018. — Vol. 97, N 17. — e0589.

11. Maharaj S., Xue R., Rojan A. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) response following COVID-19 infection: Implications for the ADAMTS-13-von Willebrand factor axis // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2021. — Vol. 19, N 4. — P. 1130-1132.
12. Bodó I., Eikenboom J., Montgomery R., Patzke J., Schneppenheim R., Di Paola J. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2015. — Vol. 13, N 7. — P. 1345-1350.
13. Gadisseur A., Hermans C., Berneman Z., Schroyens W., Deckmyn H., Michiels J.J. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease // *Acta haematologica* — 2009. — Vol. 121, N 2-3. — P. 71-84.
14. Ng C.J., Di Paola J. von Willebrand Disease: Diagnostic Strategies and Treatment Options // *Pediatric clinics of North America* — 2018. — Vol. 65, N 3. — P. 527-541.
15. Zhang C., Neelamegham S. Application of microfluidic devices in studies of thrombosis and hemostasis // *Platelets* — 2017. — Vol. 28, N 5. — P. 434-440.
16. Lordkipanidzé M. Platelet Function Tests // *Seminars in thrombosis and hemostasis* — 2016. — Vol. 42, N 3. — P. 258-267.
17. Li R., Grosser T., Diamond S.L. Microfluidic whole blood testing of platelet response to pharmacological agents // *Platelets* — 2017. — Vol. 28, N 5. — P. 457-462.
18. Jain A., Graveline A., Waterhouse A., Vernet A., Flaumenhaft R., Ingber D.E. A shear gradient-activated microfluidic device for automated monitoring of whole blood haemostasis and platelet function // *Nature communications* — 2016. — Vol. 7. — e10176.
19. Branchford B.R., Ng C.J., Neeves K.B., Di Paola J. Microfluidic technology as an emerging clinical tool to evaluate thrombosis and hemostasis // *Thrombosis research* — 2015. — Vol. 136, N 1. — P. 13-19.



20. Lenting P.J., Christophe O.D., Denis C.V. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends // *Blood* — 2015. — Vol. 125, N 13. — P. 2019-2028.
21. Von Willebrand E.A. Hereditary pseudohaemophilia // *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* — 1999. — Vol. 5, N 3. — P. 223-231.
22. Sadler J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor // *Annual review of biochemistry* — 1998. — Vol. 67. — P. 395-424.
23. Larrieu M.J., Soulier J.P. [Deficiency of antihemophilic factor A in a girl associated with bleeding disorder] // *Revue d'hematologie* — 1953. — Vol. 8, N 3. — P. 361-370.
24. Nilsson I.M., Blomback M., Von Francken I. On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time // *Acta medica Scandinavica* — 1957. — Vol. 159, N 1. — P. 35-57.
25. Nilsson I.M., Blomback M., Jorpes E., Blomback B., Johansson S.A. Von Willebrand's disease and its correction with human plasma fraction 1-0 // *Acta medica Scandinavica* — 1957. — Vol. 159, N 3. — P. 179-188.
26. Davie E.W., Ratnoff O.D. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING // *Science (New York, NY)* — 1964. — Vol. 145, N 3638. — P. 1310-1312.
27. Macfarlane R.G. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER // *Nature* — 1964. — Vol. 202. — P. 498-499.
28. McMichael M. New models of hemostasis // *Topics in companion animal medicine* — 2012. — Vol. 27, N 2. — P. 40-45.
29. Reininger A.J. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis // *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* — 2008. — Vol. 14 Suppl 5. — P. 11-26.

30. Zimmerman T.S., Ratnoff O.D., Powell A.E. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor // *The Journal of clinical investigation* — 1971. — Vol. 50, N 1. — P. 244-254.
31. Kiouptsi K., Reinhardt C. Physiological Roles of the von Willebrand Factor-Factor VIII Interaction // *Sub-cellular biochemistry* — 2020. — Vol. 94. — P. 437-464.
32. Hoffman M., Monroe D.M., 3rd A cell-based model of hemostasis // *Thrombosis and haemostasis* — 2001. — Vol. 85, N 6. — P. 958-965.
33. O'Donnell J.S., O'Sullivan J.M., Preston R.J.S. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis // *British journal of haematology* — 2019. — Vol. 186, N 1. — P. 24-36.
34. Ferreira C., Sousa M., Dusse L., Carvalho M. A cell-based model of coagulation and its implications // *Rev Bras Hematol Hemoter* — 2010. — Vol. 32, N 5. — P. 416-421.
35. Smith S.A. The cell-based model of coagulation // *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex : 2001)* — 2009. — Vol. 19, N 1. — P. 3-10.
36. Счастливец И.В., Лобастов К.В., Цаплин С.Н., Мкртычев Д.С. Современный взгляд на систему гемостаза: клеточная теория // *Медицинский совет* — 2019. N 16. — С. 72-77.
37. Ginsburg D., Handin R.I., Bonthron D.T., Donlon T.A., Bruns G.A., Latt S.A., Orkin S.H. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization // *Science (New York, NY)* — 1985. — Vol. 228, N 4706. — P. 1401-1406.
38. Patracchini P., Calzolari E., Aiello V., Palazzi P., Banin P., Marchetti G., Bernardi F. Sublocalization of von Willebrand factor pseudogene to 22q11.22-q11.23 by in situ hybridization in a 46,X,t(X;22)(pter;q11.21) translocation // *Human genetics* — 1989. — Vol. 83, N 3. — P. 264-266.

39. Pannekoek H., Voorberg J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor // *Bailliere's clinical haematology* — 1989. — Vol. 2, N 4. — P. 879-896.
40. Zhou Y.F., Eng E.T., Zhu J., Lu C., Walz T., Springer T.A. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor // *Blood* — 2012. — Vol. 120, N 2. — P. 449-458.
41. James P., Rydz R. Structure, Biology, and Genetics of von Willebrand Factor // *Hematology* — 2018. — Chap.138 — P. 2051-2063.
42. Springer T.A. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2011. — Vol. 9 Suppl 1, N 1. — P. 130-143.
43. Berriman J.A., Li S., Hewlett L.J., Wasilewski S., Kiskin F.N., Carter T., Hannah M.J., Rosenthal P.B. Structural organization of Weibel-Palade bodies revealed by cryo-EM of vitrified endothelial cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* — 2009. — Vol. 106, N 41. — P. 17407-11742.
44. van de Ven W.J., Voorberg J., Fontijn R., Pannekoek H., van den Ouweland A.M., van Duijnhoven H.L., Roebroek A.J., Siezen R.J. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes // *Molecular biology reports* — 1990. — Vol. 14, N 4. — P. 265-275.
45. Valentijn K.M., Sadler J.E., Valentijn J.A., Voorberg J., Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies // *Blood* — 2011. — Vol. 117, N 19. — P. 5033-5043.
46. Cramer E.M., Caen J.P., Drouet L., Breton-Gorius J. Absence of tubular structures and immunolabeling for von Willebrand factor in the platelet alpha-granules from porcine von Willebrand disease // *Blood* — 1986. — Vol. 68, N 3. — P. 774-778.
47. Matsui T., Titani K., Mizuochi T. Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures // *The Journal of biological chemistry* — 1992. — Vol. 267, N 13. — P. 8723-8731.

48. Bowen D.J. An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13 // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2003. — Vol. 1, N 1. — P. 33-40.
49. Stocksclaeder M., Schneppenheim R., Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis // *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* — 2014. — Vol. 25, N 3. — P. 206-216.
50. Richardson M., Tinlin S., De Reske M., Webster S., Senis Y., Giles A.R. Morphological alterations in endothelial cells associated with the release of von Willebrand factor after thrombin generation in vivo // *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* — 1994. — Vol. 14, N 6. — P. 990-999.
51. Jonnalagadda D., Izu L.T., Whiteheart S.W. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner // *Blood* — 2012. — Vol. 120, N 26. — P. 5209-5216.
52. Blair P., Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates // *Blood reviews* — 2009. — Vol. 23, N 4. — P. 177-189.
53. Kim D.A., Ashworth K.J., Di Paola J., Ku D.N. Platelet  $\alpha$ -granules are required for occlusive high-shear-rate thrombosis // *Blood advances* — 2020. — Vol. 4, N 14. — P. 3258-3267.
54. Lancellotti S., Sacco M., Basso M., De Cristofaro R. Mechanochemistry of von Willebrand factor // *Biomolecular concepts* — 2019. — Vol. 10, N 1. — P. 194-208.
55. Zhang Q., Zhou Y.F., Zhang C.Z., Zhang X., Lu C., Springer T.A. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* — 2009. — Vol. 106, N 23. — P. 9226-9231.
56. Bryckaert M., Rosa J.P., Denis C.V., Lenting P.J. Of von Willebrand factor and platelets // *Cellular and molecular life sciences : CMLS* — 2015. — Vol. 72, N 2. — P. 307-326.

57. South K., Lane D.A. ADAMTS-13 and von Willebrand factor: a dynamic duo // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2018. — Vol. 16, N 1. — P. 6-18.
58. South K., Luken B.M., Crawley J.T., Phillips R., Thomas M., Collins R.F., Deforche L., Vanhoorelbeke K., Lane D.A. Conformational activation of ADAMTS13 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* — 2014. — Vol. 111, N 52. — P. 18578-18583.
59. Saha M., McDaniel J.K., Zheng X.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura: pathogenesis, diagnosis and potential novel therapeutics // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2017. — Vol. 15, N 10. — P. 1889-1900.
60. Fogarty H., Doherty D., O'Donnell J.S. New developments in von Willebrand disease // *British journal of haematology* — 2020. — Vol. 191, N 3. — P. 329-339.
61. Casonato A., Galletta E., Cella G., Barbon G., Daidone V. Acquired von Willebrand Syndrome Hiding Inherited von Willebrand Disease Can Explain Severe Bleeding in Patients With Aortic Stenosis // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* — 2020. — Vol. 40, N 9. — P. 2187-2194.
62. Zhang C., Kelkar A., Neelamegham S. von Willebrand factor self-association is regulated by the shear-dependent unfolding of the A2 domain // *Blood advances* — 2019. — Vol. 3, N 7. — P. 957-968.
63. Rauch A., Wohner N., Christophe O.D., Denis C.V., Susen S., Lenting P.J. On the versatility of von Willebrand factor // *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* — 2013. — Vol. 5, N 1. — e2013046.
64. Zhang X., Halvorsen K., Zhang C.Z., Wong W.P., Springer T.A. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor // *Science (New York, NY)* — 2009. — Vol. 324, N 5932. — P. 1330-1334.
65. Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C., Favaloro E.J., Hill F.G., Holmberg L., Ingerslev J., Lee C.A., Lillicrap D., Mannucci P.M. *et al* Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2006. — Vol. 4, N 10. — P. 2103-2114.

66. James P.D., Connell N.T., Ameer B., Di Paola J., Eikenboom J., Giraud N., Haberichter S., Jacobs-Pratt V., Konkle B., McLintock C. *et al* ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease // *Blood advances* — 2021. — Vol. 5, N 1. — P. 280-300.
67. van Galen K.P., Mauser-Bunschoten E.P., Leebeek F.W. Hemophilic arthropathy in patients with von Willebrand disease // *Blood reviews* — 2012. — Vol. 26, N 6. — P. 261-266.
68. Leebeek F.W., Eikenboom J.C. Von Willebrand's Disease // *The New England journal of medicine* — 2016. — Vol. 375, N 21. — P. 2067-2080.
69. Simone J.V., Cornet J.A., Abildgaard C.F. Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythematosus // *Blood* — 1968. — Vol. 31, N 6. — P. 806-812.
70. Federici A.B., Rand J.H., Bucciarelli P., Budde U., van Genderen P.J., Mohri H., Meyer D., Rodeghiero F., Sadler J.E. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry // *Thrombosis and haemostasis* — 2000. — Vol. 84, N 2. — P. 345-349.
71. Leebeek F.W.G. New Developments in Diagnosis and Management of Acquired Hemophilia and Acquired von Willebrand Syndrome // *HemaSphere* — 2021. — Vol. 5, N 6. — e586.
72. Ibrahim H., Rondina M.T., Kleiman N.S. Von Willebrand factor and the aortic valve: Concepts that are important in the transcatheter aortic valve replacement era // *Thrombosis research* — 2018. — Vol. 170. — P. 20-27.
73. Warkentin T.E., Moore J.C., Morgan D.G. Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link? // *Lancet (London, England)* — 1992. — Vol. 340, N 8810. — P. 35-37.
74. Randi A.M., Smith K.E., Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation // *Blood* — 2018. — Vol. 132, N 2. — P. 132-140.
75. Theis S.R., Turner S.D. Heyde Syndrome // *Treasure Island*, — 2021.
76. Seaman C.D., Yabes J., Comer D.M., Ragni M.V. Does deficiency of von Willebrand factor protect against cardiovascular disease? Analysis of a national

- discharge register // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2015. — Vol. 13, N 11. — P. 1999-2003.
77. Xu A.G., Xu R.M., Lu C.Q., Yao M.Y., Zhao W., Fu X., Guo J., Xu Q.F., Li D.D. Correlation of von Willebrand factor gene polymorphism and coronary heart disease // *Molecular medicine reports* — 2012. — Vol. 6, N 5. — P. 1107-1110.
78. Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D., Haverkate F., van de Loo J.C. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group // *The New England journal of medicine* — 1995. — Vol. 332, N 10. — P. 635-641.
79. Spiel A.O., Gilbert J.C., Jilma B. von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes // *Circulation* — 2008. — Vol. 117, N 11. — P. 1449-1459.
80. Morange P.E., Simon C., Alessi M.C., Luc G., Arveiler D., Ferrieres J., Amouyel P., Evans A., Ducimetiere P., Juhan-Vague I. Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study // *Circulation* — 2004. — Vol. 109, N 11. — P. 1343-1348.
81. Joly B.S., Coppo P., Veyradier A. An update on pathogenesis and diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura // *Expert review of hematology* — 2019. — Vol. 12, N 6. — P. 383-395.
82. Moake J.L., Rudy C.K., Troll J.H., Weinstein M.J., Colannino N.M., Azocar J., Seder R.H., Hong S.L., Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura // *The New England journal of medicine* — 1982. — Vol. 307, N 23. — P. 1432-1435.
83. Fujikawa K., Suzuki H., McMullen B., Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family // *Blood* — 2001. — Vol. 98, N 6. — P. 1662-1666.

84. Sadler J.E. What's new in the diagnosis and pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura // *Hematology American Society of Hematology Education Program* — 2015. — Vol. 2015, N 1. — P. 631-636.
85. Hollifield A.L., Arnall J.R., Moore D.C. Caplacizumab: an anti-von Willebrand factor antibody for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura // *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* — 2020. — Vol. 77, N 15. — P. 1201-1207.
86. Scully M., Knöbl P., Kentouche K., Rice L., Windyga J., Schneppenheim R., Kremer Hovinga J.A., Kajiwara M., Fujimura Y., Maggiore C. *et al* Recombinant ADAMTS-13: first-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura // *Blood* — 2017. — Vol. 130, N 19. — P. 2055-2063.
87. Wool G.D., Miller J.L. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation // *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* — 2021. — Vol. 88, N 1. — P. 15-27.
88. Parisi R., Costanzo S., Di Castelnuovo A., de Gaetano G., Donati M.B., Iacoviello L. Different Anticoagulant Regimens, Mortality, and Bleeding in Hospitalized Patients with COVID-19: A Systematic Review and an Updated Meta-Analysis // *Seminars in thrombosis and hemostasis* — 2021. — Vol. 47, N 4. — P. 372-391.
89. Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Михалева Л.М., Черняев А.Л., Мишнев О.Д., Крупнов Н.М., Д.В. К. Патологическая анатомия COVID-19: Атлас. — Москва: ГБУ "НИИОЗММ ДЗМ", 2020.
90. Ali M.A.M., Spinler S.A. COVID-19 and thrombosis: From bench to bedside // *Trends in cardiovascular medicine* — 2021. — Vol. 31, N 3. — P. 143-160.
91. Mehta P.K., Griendling K.K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system // *American journal of physiology Cell physiology* — 2007. — Vol. 292, N 1. — P. 82-97.
92. Лянгузов А.В., Сергунина О.Ю., Игнатьев С.В., Ковтунова М.Е., Калинина С.Л., Семакин А.С. Роль фактора фон Виллебранда в развитии системного



- воспаления, коагулопатии и органических дисфункций // Тромбоз, гемостаз и реология — 2021. N 3. — С. 4-11.
93. Favalaro E.J., Henry B.M., Lippi G. Increased VWF and Decreased ADAMTS-13 in COVID-19: Creating a Milieu for (Micro)Thrombosis // *Seminars in thrombosis and hemostasis* — 2021. — Vol. 47, N 4. — P. 400-418.
94. Ladikou E.E., Sivaloganathan H., Milne K.M., Arter W.E., Ramasamy R., Saad R., Stoneham S.M., Philips B., Eziefula A.C., Chevassut T. Von Willebrand factor (vWF): marker of endothelial damage and thrombotic risk in COVID-19? // *Clinical medicine (London, England)* — 2020. — Vol. 20, N 5. — e178-182.
95. Mancini I., Baronciani L., Artoni A., Colpani P., Biganzoli M., Cozzi G., Novembrino C., Boscolo Anzoletti M., De Zan V., Pagliari M.T. *et al* The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2021. — Vol. 19, N 2. — P. 513-521.
96. Vanhoorelbeke K., Cauwenberghs N., Vauterin S., Schlamadinger A., Mazurier C., Deckmyn H. A reliable and reproducible ELISA method to measure ristocetin cofactor activity of von Willebrand factor // *Thrombosis and haemostasis* — 2000. — Vol. 83, N 1. — P. 107-113.
97. Lawrie A.S., Stufano F., Canciani M.T., Mackie I.J., Machin S.J., Peyvandi F. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity // *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* — 2013. — Vol. 19, N 2. — P. 338-342.
98. Kasai M., Osako M., Inaba Y., Yamabe K., Aoki M. Acquired von Willebrand syndrome secondary to mitral and aortic regurgitation // *Journal of cardiac surgery* — 2020. — Vol. 30, N 9. — P. 1108.e1109-1108.e1110.
99. Favalaro E.J. The Platelet Function Analyser (PFA)-100 and von Willebrand disease: a story well over 16 years in the making // *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* — 2015. — Vol. 21, N 5. — P. 642-645.

100. Schoeman R.M., Lehmann M., Neeves K.B. Flow chamber and microfluidic approaches for measuring thrombus formation in genetic bleeding disorders // *Platelets* — 2017. — Vol. 28, N 5. — P. 463-471.
101. Baumgartner H.R. Eine neue Methode zur Erzeugung von Thromben durch gezielte Überdehnung der Gefäßwand // *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* — 1963. — Vol. 137, N 3. — P. 227-247.
102. Zilberman-Rudenko J., Sylman J.L., Garland K.S., Puy C., Wong A.D., Searson P.C., McCarty O.J.T. Utility of microfluidic devices to study the platelet-endothelium interface // *Platelets* — 2017. — Vol. 28, N 5. — P. 449-456.
103. Sakariassen K.S., Bolhuis P.A., Sixma J.J. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium // *Nature* — 1979. — Vol. 279, N 5714. — P. 636-638.
104. Turitto V.T., Baumgartner H.R. Platelet interaction with subendothelium in flowing rabbit blood: effect of blood shear rate // *Microvascular research* — 1979. — Vol. 17, N 1. — P. 38-54.
105. Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J., Whitesides G.M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane) // *Analytical chemistry* — 1998. — Vol. 70, N 23. — P. 4974-4984.
106. NLM MESH / режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=microfluidic> (дата обращения 30.11.2021).
107. Neeves K.B., Maloney S.F., Fong K.P., Schmaier A.A., Kahn M.L., Brass L.F., Diamond S.L. Microfluidic focal thrombosis model for measuring murine platelet deposition and stability: PAR4 signaling enhances shear-resistance of platelet aggregates // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2008. — Vol. 6, N 12. — P. 2193-2201.
108. Westein E., de Witt S., Lamers M., Cosemans J.M., Heemskerk J.W. Monitoring in vitro thrombus formation with novel microfluidic devices // *Platelets* — 2012. — Vol. 23, N 7. — P. 501-509.

109. Maloney S.F., Brass L.F., Diamond S.L. P2Y<sub>12</sub> or P2Y<sub>1</sub> inhibitors reduce platelet deposition in a microfluidic model of thrombosis while apyrase lacks efficacy under flow conditions // *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* — 2010. — Vol. 2, N 4. — P. 183-192.
110. Li R., Fries S., Li X., Grosser T., Diamond S.L. Microfluidic assay of platelet deposition on collagen by perfusion of whole blood from healthy individuals taking aspirin // *Clinical chemistry* — 2013. — Vol. 59, N 8. — P. 1195-1204.
111. Li R., Diamond S.L. Detection of platelet sensitivity to inhibitors of COX-1, P2Y<sub>1</sub>, and P2Y<sub>1</sub>(2) using a whole blood microfluidic flow assay // *Thrombosis research* — 2014. — Vol. 133, N 2. — P. 203-210.
112. Colace T.V., Tormoen G.W., McCarty O.J., Diamond S.L. Microfluidics and coagulation biology // *Annual review of biomedical engineering* — 2013. — Vol. 15. — P. 283-303.
113. Tischer A., Madde P., Blancas-Mejia L.M., Auton M. A molten globule intermediate of the von Willebrand factor A1 domain firmly tethers platelets under shear flow // *Proteins* — 2014. — Vol. 82, N 5. — P. 867-878.
114. Zheng Y., Chen J., Craven M., Choi N.W., Totorica S., Diaz-Santana A., Kermani P., Hempstead B., Fischbach-Teschl C., López J.A. *et al* In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* — 2012. — Vol. 109, N 24. — P. 9342-9347.
115. Bao J., Xiao J., Mao Y., Zheng X.L. Carboxyl terminus of ADAMTS13 directly inhibits platelet aggregation and ultra large von Willebrand factor string formation under flow in a free-thiol-dependent manner // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* — 2014. — Vol. 34, N 2. — P. 397-407.
116. Van Kruchten R., Cosemans J.M., Heemskerk J.W. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers - a practical guide // *Platelets* — 2012. — Vol. 23, N 3. — P. 229-242.

117. Claesson K., Lindahl T.L., Faxalv L. Counting the platelets: a robust and sensitive quantification method for thrombus formation // *Thrombosis and haemostasis* — 2016. — Vol. 115, N 6. — P. 1178-1190.
118. Nesbitt W.S., Tovar-Lopez F.J., Westein E., Harper I.S., Jackson S.P. A multimode-TIRFM and microfluidic technique to examine platelet adhesion dynamics // *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) — 2013. — Vol. 1046. — P. 39-58.
119. Puckett L.G., Barrett G., Kouzoudis D., Grimes C., Bachas L.G. Monitoring blood coagulation with magnetoelastic sensors // *Biosensors & bioelectronics* — 2003. — Vol. 18, N 5-6. — P. 675-681.
120. Ergezen E., Appel M., Shah P., Kresh J.Y., Lec R.M., Wootton D.M. Real-time monitoring of adhesion and aggregation of platelets using thickness shear mode (TSM) sensor // *Biosensors & bioelectronics* — 2007. — Vol. 23, N 4. — P. 575-582.
121. Hansson K.M., Johansen K., Wettero J., Klenkar G., Benesch J., Lundstrom I., Lindahl T.L., Tengvall P. Surface plasmon resonance detection of blood coagulation and platelet adhesion under venous and arterial shear conditions // *Biosensors & bioelectronics* — 2007. — Vol. 23, N 2. — P. 261-268.
122. Lei K.F., Chen K.H., Tsui P.H., Tsang N.M. Real-time electrical impedimetric monitoring of blood coagulation process under temperature and hematocrit variations conducted in a microfluidic chip // *PloS one* — 2013. — Vol. 8, N 10. — e76243.
123. Polgar L., Soos P., Lajko E., Lang O., Merkely B., Kohidai L. Platelet impedance adhesiometry: A novel technique for the measurement of platelet adhesion and spreading // *International journal of laboratory hematology* — 2018. — in print.
124. ACEA Biosciences Inc. xCELLigence® RTCA SP /. — —, режим доступа: <https://www.aceabio.com/products/rtca-sp/> (дата обращения 17.04.2018).
125. Neeves K.B., Onasoga A.A., Wufsus A.R. The use of microfluidics in hemostasis: clinical diagnostics and biomimetic models of vascular injury // *Current opinion in hematology* — 2013. — Vol. 20, N 5. — P. 417-423.

126. Hastings S.M., Griffin M.T., Ku D.N. Hemodynamic studies of platelet thrombosis using microfluidics // *Platelets* — 2017. — Vol. 28, N 5. — P. 427-433.
127. Brouns S.L.N., van Geffen J.P., Heemskerk J.W.M. High-throughput measurement of human platelet aggregation under flow: application in hemostasis and beyond // *Platelets* — 2018. — Vol. 29, N 7. — P. 662-669.
128. Berndt M.C., Du X.P., Booth W.J. Ristocetin-dependent reconstitution of binding of von Willebrand factor to purified human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex // *Biochemistry* — 1988. — Vol. 27, N 2. — P. 633-640.
129. Янушевская Е.В., Баркевич Е.А., Хаспекова С.Г., Наймушин Я.А., Власик Т.Н., Лихачева Е.А., Плющ О.П., Мазуров А.В. Определение фактора Виллебранда с помощью иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител. Применение метода для диагностики болезни Виллебранда. // *Гематолог Трансфузиолог* — 2005. — Т. 5, N 2. — С. 20-25.
130. Herbig B.A., Diamond S.L. Pathological von Willebrand factor fibers resist tissue plasminogen activator and ADAMTS13 while promoting the contact pathway and shear-induced platelet activation // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* — 2015. — Vol. 13, N 9. — P. 1699-1708.
131. Kroll M.H., Hellums J.D., McIntire L.V., Schafer A.I., Moake J.L. Platelets and shear stress // *Blood* — 1996. — Vol. 88, N 5. — P. 1525-1541.
132. Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Габбасов З.А. Регистрация в реальном времени адгезии тромбоцитов на иммобилизованном на оптической подложке фибриногеновом покрытии в условиях потока // *Клеточные технологии в биологии и медицине* — 2018. N 1. — С. 48-52.
133. Casa L.D.C., Ku D.N. Thrombus Formation at High Shear Rates // *Annual review of biomedical engineering* — 2017. — Vol. 19. — P. 415-433.
134. Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Охота С.Д., Зозуля Н.И., Габбасов З.А. Кинетика адгезии тромбоцитов к покрытой белком поверхности в образцах цельной крови в условиях высоких скоростей потока // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* — 2020. — Т. 169, N 2. — С. 188-192.

135. Автаева Ю.Н., Мельников И.С., Сабурова О.С., Гурия К.Г., Осидак М.С., Домогадский С.П., Габбасов З.А. Взаимодействие тромбоцитов, фактора фон Виллебранда и лейкоцитов в цельной крови при высоких скоростях сдвига опосредовано GPIIb/IIIa тромбоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины — 2021. — Т. 171, N 5. — С. 557-561.
136. Gabbasov Z.A., Avtaeva Y.N., Melnikov I.S., Okhota S.D., Caprnda M., Mozos I., Prosecky R., Rodrigo L., Kruzliak P., Zozulya N.I. Kinetics of platelet adhesion to a fibrinogen-coated surface in whole blood under flow conditions // Journal of clinical laboratory analysis — 2021. — Vol. 35, N 9. — e23939.
137. Brass L.F., Diamond S.L. Transport physics and biorheology in the setting of hemostasis and thrombosis // Journal of thrombosis and haemostasis : JTH — 2016. — Vol. 14, N 5. — P. 906-917.
138. Guha Thakurta S., Miller R., Subramanian A. Adherence of platelets to in situ albumin-binding surfaces under flow conditions: role of surface-adsorbed albumin // Biomedical materials (Bristol, England) — 2012. — Vol. 7, N 4. — e045007.
139. Tsai W.B., Grunkemeier J.M., McFarland C.D., Horbett T.A. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor // Journal of biomedical materials research — 2002. — Vol. 60, N 3. — P. 348-359.
140. Ikeda Y., Handa M., Kawano K., Kamata T., Murata M., Araki Y., Anbo H., Kawai Y., Watanabe K., Itagaki I. *et al* The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress // The Journal of clinical investigation — 1991. — Vol. 87, N 4. — P. 1234-1240.
141. Bernardo A., Ball C., Nolasco L., Choi H., Moake J.L., Dong J.F. Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress // Journal of thrombosis and haemostasis : JTH — 2005. — Vol. 3, N 3. — P. 562-570.
142. Kawecki C., Lenting P.J., Denis C.V. von Willebrand factor and inflammation // Journal of thrombosis and haemostasis : JTH — 2017. — Vol. 15, N 7. — P. 1285-1294.

143. Gragnano F., Sperlongano S., Golia E., Natale F., Bianchi R., Crisci M., Fimiani F., Pariggiano I., Diana V., Carbone A. *et al* The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy // *Mediators of inflammation* — 2017. — Vol. 2017. — P. 5620314.
144. Petri B., Broermann A., Li H., Khandoga A.G., Zarbock A., Krombach F., Goerge T., Schneider S.W., Jones C., Nieswandt B. *et al* von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation // *Blood* — 2010. — Vol. 116, N 22. — P. 4712-4719.
145. Nicolai L., Massberg S. Platelets as key players in inflammation and infection // *Current opinion in hematology* — 2020. — Vol. 27, N 1. — P. 34-40.
146. d'Alessandro E., Becker C., Bergmeier W., Bode C., Bourne J.H., Brown H., Buller H.R., Ten Cate-Hoek A.J., Ten Cate V., van Cauteren Y.J.M. *et al* Thrombo-Inflammation in Cardiovascular Disease: An Expert Consensus Document from the Third Maastricht Consensus Conference on Thrombosis // *Thrombosis and haemostasis* — 2020. — Vol. 120, N 4. — P. 538-564.
147. Nieswandt B., Kleinschnitz C., Stoll G. Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? // *The Journal of physiology* — 2011. — Vol. 589, N 17. — P. 4115-4123.
148. Scully M., Cataland S.R., Peyvandi F., Coppo P., Knöbl P., Kremer Hovinga J.A., Metjian A., de la Rubia J., Pavenski K., Callewaert F. *et al* Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura // *The New England journal of medicine* — 2019. — Vol. 380, N 4. — P. 335-346.
149. Bhogal P., Jensen M., Hart D., Makalanda L., Collins G.B., Spooner O., Jaffer O. Von Willebrand factor // *Clinical medicine (London, England)* — 2020. — Vol. 20, N 6. — e279.

### Приложение №1.

Технология изготовления микрофлюидной проточной камеры с использованием ПДМС. а - ж – создание жесткой «реплики» с отрицательным рисунком каналов на силиконовой подложке с фоторезистом SU-8; з – нанесение смеси олигомеров ПДМС на «реплику» для затвердевания путем полимеризации; и – получение проточной камеры путем соединения ПДМС штампа со стеклом. Si – кремний, УФ свет – ультрафиолетовый свет, ПДМС - полидиметилсилоксан.

